



Utilização da citometria de fluxo multiparamétrica na monitorização da resposta fisiológica da levedura *Saccharomyces carlsbergensis* em presença de ácido fórmico na produção de bioetanol

Elisabete Dias das Neves

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia de Sistemas Bioenergéticos

Orientador: Doutora Maria Teresa Saraiva Lopes da Silva

Co-orientador: Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito

Co-orientador: Doutora Paula Cristina Lima Varela Passarinho

Júri:

Presidente: Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias Vicente, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutor Alberto José Delgado dos Reis, Investigador Auxiliar do Laboratório Nacional de Energia e Geologia, I.P.;

Doutora Paula Cristina Lima Varela Passarinho, Investigadora Auxiliar do Laboratório Nacional de Energia e Geologia, I.P.;

Doutora Maria Teresa Saraiva Lopes da Silva, Técnica Superior Principal do Laboratório Nacional de Energia e Geologia, I.P..

Lisboa, 2011

Agradecimentos

A realização deste trabalho final, surge como culminar de um percurso esforçado, longas noites e dias, onde o passar das horas se debatia com o escorregar do tempo. Por vezes, uma corrida contra o tempo e o sono sempre adiado.

O primeiro agradecimento, não podia deixar de ficar para a Cláudia, colega de mestrado, companheira no laboratório e na batalha que foram os nossos horários “inconjugáveis”. Pela paciência, pela cumplicidade, pelas conversas e partilhas sobre tudo e sobre nada.

Aos colegas de laboratório, em particular à Carla e à Leonor, um agradecimento pela paciência e respostas sempre prontas às perguntas intermináveis sobre o sítio de todas as coisas.

Ao Doutor Alberto, um “muito obrigada” pela recepção no LNEG e preocupação pelo desenvolvimento do trabalho.

À Doutora Teresa pela disponibilidade, pelas explicações, pelas correcções, pelos conselhos, pela paciência e pela experiência que proporcionou ao orientar todo o trabalho mas sobretudo, pela capacidade de despertar a curiosidade, o interesse e o espírito crítico.

À Doutora Paula pelas valiosas explicações e correcções ao longo dos ensaios e construção do trabalho final.

À Dra Luísa Brito pela disponibilidade, simpatia e pelo interesse demonstrado.

Às minhas colegas/amigas de trabalho pela compreensão, preocupação e por tornarem o desenvolvimento deste projecto possível.

Ao meu pai e avô, sempre presentes na sua ausência física, pelo valioso saber que me ensinaram através das mais pequenas coisas. À minha mãe, irmãos e cunhados que sempre me acreditaram e contagiaram com a sua força. Um sorriso retribuído também aos meus sobrinhos pela lembrança de que as mais pequenas descobertas podem ser as mais importantes.

Obrigada ao João pelo conforto nos momentos mais difíceis, pelo abrigo e por saber sempre as palavras certas para os espaços mais vazios.

Resumo

A crescente preocupação com os impactos ambientais relacionados com a utilização de combustíveis fósseis tem vindo a estimular o interesse na procura de fontes de energia renováveis.

Este trabalho teve como principal objectivo, a monitorização por citometria de fluxo multiparamétrica do estado fisiológico da levedura *Saccharomyces carlsbergensis*, em resposta ao stresse provocado pela presença de diferentes concentrações de ácido fórmico, em ensaios de fermentação alcoólica.

Relativamente à produção de biomassa verificou-se que esta é mais afectada pela presença de ácido fórmico para concentrações superiores a 5 g.L⁻¹, embora decrescendo com o aumento da concentração de inibidor. O menor rendimento registou-se com a concentração de 20 g.L⁻¹ (0,034 g.g⁻¹), ensaio para o qual se observou também menor produção de etanol (35% do valor da concentração máxima do ensaio sem inibidor).

As análises realizadas a partir de citometria de fluxo multiparamétrica mostraram que na presença de 5 g.L⁻¹ de inibidor existem já evidências de stresse, com um aumento considerável da percentagem de células despolarizadas e com aparecimento de espécies reactivas de oxigénio na fase exponencial, embora as células continuem a responder quanto à produção de biomassa e etanol.

No que diz respeito à produção de etanol, esta levedura pode ser interessante para aplicação em fermentação de hidrolisados lenhocelulósicos pois apresenta uma boa resistência ao ácido fórmico, face a resultados obtidos em relação a outras leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae*, cujos efeitos fortes de inibição relativamente à produção de etanol se fazem sentir a partir de concentrações de 4,6 g.L⁻¹ de ácido fórmico (Larson *et al.*, 2009).

Palavras-Chave: Bioetanol, *Saccharomyces carlsbergensis*, inibição, ácido fórmico, citometria de fluxo multiparamétrica.

Abstract

The concern with the environmental impacts regarding the use of fossil fuels in the energy sector has triggered the search for new renewable energy sources.

The aim of this study was to monitor the physiological response of the yeast *Saccharomyces carlsbergensis* cells in fermentation assays performed with the addition of formic acid by multi-parameter flow cytometry.

The biomass production was more affected by formic acid concentrations higher than 5 g.L⁻¹. Nevertheless, the lowest biomass yield (0,034g.g⁻¹) as well as the lower ethanol yield (35% reduction regarding the assay without inhibitor) were attained with 20g.L⁻¹ of formic acid.

The multi-parameter flow cytometry analysis showed that in the presence of 5 g.L⁻¹ of inhibitor during the exponential growth phase there are some stress indicators such as the increase in the number of cells with depolarized membrane and the increase in the number of cells with reactive oxygen species, although the yeast continues to respond in terms of biomass and ethanol productions.

The results on ethanol production indicate that the use of this yeast in lignocellulosic hydrolysates fermentation may be interesting due to its resistance to the effect of formic acid when compared to other yeasts like *Saccharomyces cerevisiae* whose inhibition effects of formic acid are registered for concentrations over 4,6 g.L⁻¹ (Larson *et al.*, 2009).

Key-words: bioethanol, *Saccharomyces carlsbergensis*, inhibition, formic acid, multi-parameter flow cytometry.

Extended abstract

The concern with environmental impacts related to the use of fossil fuels in the energy sector has triggered the search for new renewable energy sources. In this field, biofuels produced by the fermentation of lignocellulosic materials, such as bioethanol, have been considered an interesting energy source at both economic and environmental levels.

2nd generation bioethanol is generally produced from lignocellulosic biomass. The complexity of this raw-material demands a pre-treatment to promote saccharification in order to obtain a fermentable sugar fraction. However, the usual processes applied to lignocellulosic biomass generate some degradation products (formic and acetic acids, furfural and hydroxymethylfurfural) that have been identified as inhibitors of yeast fermentation.

So, the main objective of this study was to monitor the physiological conditions of the yeast *Saccharomyces carlsbergensis* when under stress caused by the presence of different amounts of formic acid through multi-parameter flow cytometry analysis. Kinetic parameters were evaluated in order to characterize yeast growth and ethanol production.

It was observed that concentrations up to 20 g.L⁻¹ of formic acid had no significant inhibitor effects on ethanol production. On the other hand, the biomass production was more affected by formic acid concentrations above 5 g.L⁻¹. Nevertheless, the presence of formic acid had always a negative effect on the biomass production. The lowest biomass yield (0.03 g.g⁻¹) as well as the lowest ethanol yield (35% reduction compared to the control) were attained with 20 g.L⁻¹ of formic acid.

The multi-parameter flow cytometry analysis showed that on the presence of 5 g.L⁻¹ of inhibitor during the exponential growth phase there are some stress indicators such as the increase in the number of cells with depolarized membrane and the increase in the number of cells with reactive oxygen species although the yeast continues to respond in terms of biomass and ethanol productions.

The results on ethanol production indicate that the use of this yeast in lignocellulosic hydrolysates fermentation may be interesting due to its resistance to the effect of formic acid when compared to yeasts like *Saccharomyces cerevisiae* whose inhibition effect of formic acid are registered for concentrations over 4.6 g.L⁻¹ (Larson *et al.*, 2009).

In the future, this study must go on by performing the same type of assays and analytical procedures to study the influence of other inhibitory compounds. Tests should also be done in real conditions using lignocellulosic hydrolyzates, in order to characterize the response of the yeast to stress situations in a scenario closer to an industrial environment.

Índice

Agradecimentos.....	I
Resumo	II
Abstract	III
Extended abstract.....	IV
Índice	VI
Índice de tabelas.....	VIII
Índice de figuras	IX
Abreviaturas e símbolos	XIII
1 Objectivo do trabalho.....	1
2 Introdução	2
2.1 Biocombustíveis de 2ª geração – bioetanol	3
2.1.1 Bioetanol	3
2.1.2 Biomassa lenhocelulósica	4
2.1.3 Produção de etanol a partir de materiais lenhocelulósicos	7
2.2 Citometria de fluxo multiparamétrica	11
3 Materiais e métodos	15
3.1 Microrganismo.....	15
3.2 Reagentes.....	15
3.3 Meios de crescimento e fermentação	15
3.4 Fermentação alcoólica em presença de ácido fórmico	16
3.4.1 Crescimento da levedura.....	16
3.4.2 Fermentações	17
3.5 Caracterização do estado de viabilidade das células de levedura por citometria de fluxo	17
3.6 Métodos analíticos.....	19
3.6.1 Determinação da relação absorvância 640 nm <i>versus</i> concentração de biomassa seca para culturas de <i>S. carlsbergensis</i>	19
3.6.2 Determinação colorimétrica da concentração de glucose	20
3.6.3 Determinação da concentração de etanol por cromatografia gasosa	20
3.6.4 Determinação da concentração de ácido fórmico por HPLC.....	21
3.7 Tratamento de resultados.....	21
3.7.1 Taxa específica de crescimento	21
3.7.2 Rendimento de biomassa em função da glucose consumida ($Y_{x/\text{glu}}$).....	22

3.7.3	Rendimento de etanol em função da glucose consumida ($Y_{\text{etOH}/\text{glu}}$)	22
3.7.4	Constante de inibição de crescimento	23
4	Resultados e discussão.....	24
4.1	Crescimento de inóculos de <i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	24
4.2	Fermentação alcoólica em presença de ácido fórmico	25
4.2.1	Produção de biomassa.....	25
4.2.2	Consumo de glucose e produção de etanol.....	29
4.3	Concentração de ácido fórmico	32
4.4	Citometria de fluxo multiparamétrica	32
4.4.1	Optimização de métodos e protocolos de utilização de corantes.....	32
4.4.2	Tamanho e complexidade das células de <i>S. carsbergensis</i>	36
4.4.3	Integridade da membrana citoplasmática e potencial da membrana mitocondrial	37
4.4.4	Formação de espécies reactivas de oxigénio	48
5	Conclusões e trabalho futuro	58
	Bibliografia.....	60
	Anexo I – Reagentes químicos	65
	Anexo II – Correlação entre a absorvância e concentração de biomassa seca.....	66

Índice de tabelas

Tabela 2.1 – Produção mundial de bioetanol em 2009.	3
Tabela 3.1 - Composição do meio de repicagem.	15
Tabela 3.2 - Composição do meio utilizado nos ensaios de crescimento e fermentação.....	16
Tabela 4.1 - Tempo de duração de processo e valores de variáveis relacionados com a produção de biomassa em ensaios de fermentação por <i>S. carlsbergensis</i> em meio MC com 50 g.L ⁻¹ de glucose e em presença de ácido fórmico	26
Tabela 4.2- Valores da taxa específica de crescimento em ensaios de fermentação por <i>S. carlsbergensis</i> em meio MC com 50 g.L ⁻¹ de glucose e em presença de ácido fórmico.	27
Tabela 4.3 – Valor da constante de inibição (K_i) para o crescimento de <i>S. carlsbergensis</i> em ensaios de fermentação com 50 g.L ⁻¹ de glucose e em presença de ácido fórmico.	28
Tabela 4.4- Valores de glucose residual e de produção de etanol para ensaios de fermentação com <i>S. carlsbergensis</i> em meio MC com 50 g.L ⁻¹ de glucose em presença de ácido fórmico.	30
Tabela 0.1 – Reagentes químicos utilizados nos ensaios de fermentação e análise de amostras.....	65

Índice de figuras

Figura 2.1 - Modelo estrutural de uma lenhina de madeira de resinosa.	5
Figura 2.2 – Unidade estrutural da molécula de celulose.	5
Figura 2.3- Estrutura dos principais tipos de hemiceluloses presentes nas madeiras de folhosas e resinosa.	6
Figura 2.4-Esquema representativo da produção de bioetanol a partir de resíduos lenhocelulósicos.	8
Figura 2.5- Esquema representativo do sistema de detecção do citómetro de fluxo. ...	11
Figura 4.1 - Curva de crescimento da levedura <i>S. carlsbergensis</i>	24
Figura 4.2- Efeito da concentração de ácido fórmico na produção de biomassa em ensaios de fermentação por <i>S. carlsbergensis</i>	25
Figura 4.3 - Variação do pH ao longo de ensaios de fermentação com <i>S. carlsbergensis</i> em meio MC com 50 g.L ⁻¹ de glucose em presença de ácido fórmico.	28
Figura 4.4- Efeito da concentração de inibidor no consumo da fonte de carbono em ensaios de fermentação com <i>S. carlsbergensis</i>	31
Figura 4.5- Efeito da concentração de inibidor na produção de etanol em ensaios de fermentação com <i>S. carlsbergensis</i> em meio MC com 50 g.L ⁻¹ de glucose e em presença de ácido fórmico.	31
Figura 4.6 - Variação da concentração de inibidor em ensaios de fermentação com <i>S. carlsbergensis</i> em meio MC com 50g.L ⁻¹ de glucose e ácido fórmico.	32
Figura 4.7- Citogramas relativos a ensaios com diferentes corantes aplicados a células de <i>S. carlsbergensis</i> provenientes de um ensaio de fermentação.	33
Figura 4.8- Células de <i>S. carlsbergensis</i> coradas com DiOC ₆ (3) após incubação com CCCP.	34
Figura 4.9- Citogramas relativos a ensaios com 123-DHR aplicados a células de <i>S. carlsbergensis</i> colhidas durante ensaios de fermentação com menos de 24 h e mais de 96 h e células incubadas em etanol.	35
4.10- Histogramas referentes à evolução do tamanho (FS) das células de <i>S. carlsbergensis</i> com 0,5 g.L ⁻¹ de ácido fórmico.	36
4.11- Histogramas referentes à evolução da complexidade (SS) das células de <i>S. carlsbergensis</i> com 0,5 g.L ⁻¹ de ácido fórmico.	36
Figura 4.12 - Citograma referente ao estado da membrana de células de <i>S. carlsbergensis</i> recolhidas na fase de latência de um ensaio de fermentação sem adição de inibidor e coradas com PI e DiOC ₆ (3).	38

Figura 4.13- Citogramas referentes ao estado da membrana de células de <i>S. carlsbergensis</i> recolhidas na fase de latência de ensaios de fermentação com adição de ácido fórmico e coradas com PI e DiOC ₆ (3).	38
Figura 4.14- Células de <i>S. carlsbergensis</i> recolhidas na fase de latência (t=2h-4h) de ensaios de fermentação com concentrações crescentes de ácido fórmico.	39
Figura 4.15- Estado da membrana citoplasmática de células de <i>S. carlsbergensis</i> recolhidas na fase de latência de ensaios de fermentação em presença de ácido fórmico.	39
Figura 4.16- Citograma referente ao estado da membrana de células de <i>S. carlsbergensis</i> recolhidas na fase exponencial do ensaio de fermentação sem inibidor e coradas com PI e DiOC ₆ (3).	40
Figura 4.17- Citogramas referentes ao estado da membrana de células de <i>S. carlsbergensis</i> recolhidas na fase exponencial de ensaios de fermentação com adição de ácido fórmico e coradas com PI e DiOC ₆ (3).	41
Figura 4.18- Células de <i>S. carlsbergensis</i> recolhidas na fase exponencial (8h-72h) de ensaios de fermentação com concentrações crescentes de ácido fórmico.	41
Figura 4.19- Estado da membrana citoplasmática de células de <i>S. carlsbergensis</i> recolhidas na fase exponencial de ensaios de fermentação em presença de ácido fórmico.	42
Figura 4.20 - Citograma referente ao estado da membrana de células de <i>S. carlsbergensis</i> recolhidas na fase estacionária do ensaio de fermentação sem inibidor e coradas com PI e DiOC ₆ (3) no ensaio de controlo.	43
Figura 4.21- Citogramas referentes ao estado da membrana citoplasmática de células de <i>S. carlsbergensis</i> recolhidas na fase estacionária de ensaios de fermentação com adição de ácido fórmico e coradas com PI e DiOC ₆ (3).	44
Figura 4.22- Estado da membrana citoplasmática de células de <i>S. carlsbergensis</i> recolhidas na fase estacionária de ensaios de fermentação em presença de ácido fórmico.	45
Figura 4.23- Citograma referente ao estado da membrana de células de <i>S. carlsbergensis</i> recolhidas na fase de morte do ensaio de fermentação sem inibidor e coradas com PI e DiOC ₆ (3).	46
Figura 4.24- Citogramas referentes ao estado da membrana citoplasmática de células de <i>S. carlsbergensis</i> recolhidas na fase de morte de ensaios de fermentação em presença de ácido fórmico e coradas com PI e DiOC ₆ (3).	46
Figura 4.25 - Células de <i>S. carlsbergensis</i> recolhidas na fase de morte celular (t>48h) de ensaios de fermentação nos ensaios com concentrações crescentes de ácido fórmico.	47

Figura 4.26- Estado da membrana citoplasmática de células de <i>S. carlsbergensis</i> recolhidas na fase de morte celular de ensaios de fermentação em presença de ácido fórmico.....	48
Figura 4.27- Células de <i>S. carlsbergensis</i> , recolhidas na fase de latência de ensaios de fermentação em presença de ácido fórmico, que apresentavam evidência de espécies reactivas de oxigénio (ROS).	49
Figura 4.28- Citogramas referentes à presença de espécies reactivas de oxigénio (ROS) em células de <i>S. carlsbergensis</i> recolhidas na fase de latência do ensaio de fermentação sem inibidor e coradas com 123-DHR.	49
Figura 4.29- Citogramas referentes à presença de espécies reactivas de oxigénio (ROS) em células de <i>S. carlsbergensis</i> recolhidas na fase de latência de ensaios de fermentação em presença de ácido fórmico e coradas com 123-DHR.	50
Figura 4.30- Células de <i>S. carlsbergensis</i> , recolhidas na fase exponencial de ensaios de fermentação em presença de ácido fórmico, que apresentavam evidência de espécies reactivas de oxigénio (ROS).	51
Figura 4.31- Citogramas referentes à presença de espécies reactivas de oxigénio (ROS) em células de <i>S. carlsbergensis</i> recolhidas na fase exponencial do ensaio de fermentação sem inibidor e coradas com 123-DHR no ensaio de controlo.	51
Figura 4.32- Citogramas referentes à presença de células com espécies reactivas de oxigénio (ROS) em células de <i>S. carlsbergensis</i> recolhidas na fase exponencial de ensaios de fermentação em presença de ácido fórmico e coradas com 123-DHR.	52
Figura 4.33- Células de <i>S. carlsbergensis</i> , recolhidas na fase estacionária de ensaios de fermentação em presença de ácido fórmico, que apresentavam evidência de espécies reactivas de oxigénio (ROS).	53
Figura 4.34- Citogramas referentes à presença espécies reactivas de oxigénio (ROS) em células de <i>S. carlsbergensis</i> recolhidas na fase estacionária do ensaio de fermentação sem inibidor e coradas com 123-DHR.	54
Figura 4.35- Citogramas referentes à presença de células com espécies reactivas de oxigénio (ROS) em células de <i>S. carlsbergensis</i> recolhidas na fase estacionária de ensaios de fermentação em presença de ácido fórmico e coradas com 123-DHR.....	54
Figura 4.36- Células de <i>S. carlsbergensis</i> , recolhidas na fase de morte celular de ensaios de fermentação em presença de ácido fórmico, que apresentavam evidência de espécies reactivas de oxigénio (ROS).	55
Figura 4.37- Citogramas referentes à presença de células com espécies reactivas de oxigénio (ROS) em células de <i>S. carlsbergensis</i> recolhidas na fase de morte celular do ensaio de fermentação sem inibidor e coradas com 123-DHR.	56

Figura 4.38- Citogramas referentes à presença de células com espécies reactivas de oxigénio (ROS) em células de *S. carlsbergensis* recolhidas na fase de morte celular de ensaios de fermentação em presença de ácido fórmico e coradas com 123-DHR..... 56

Figura 0.1 – Correlação entre a absorvância 640 nm e a concentração de biomassa seca para culturas de *S. carlsbergensis*..... 66

Abreviaturas e Símbolos

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ADP – Difosfato de adenosina

ATP- Trifosfato de adenosina

BOX – Ácido Bis-(1,3-dibutilbarbitúrico) pentametino oxonol

CCCP - Cianina carbonil m-clorofenilhidrazona

CO₂ – Dióxido de carbono

DIOC₆(3) - Iodeto de 3,3'-dihexiloxacarbocianina

DNS - Ácido 3,5-dinitrosalicílico

DHR – 123-Dihidrorodamina

DMSO – Sulfóxido de dimetilo

A– Absorvância

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

etOH - Etanol

Flex - *Flexible fuel vehicles*

FSC - *Foward Angle Light Scatter*

Glu – Concentração de glucose

GC – Cromatografia gasosa

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

I_x – Concentração de inibidor

MC – Meio de cultura completo

MR – Meio de repicagem

PBS – Solução tampão de fosfato

PI – Iodeto de propídio

ROS- Espécies reactivas ao oxigénio

SO₂ – Dióxido de enxofre

SS – *Side Scatter*

UE – União Europeia

X – Concentração de biomassa

μ - Taxa específica de crescimento

Y_{X/glu} - Rendimento em biomassa em relação à fonte de carbono

Y_{etOH/glu} - Rendimento em etanol em relação à fonte de carbono

K_i - Constante de inibição do crescimento

1 Objectivo do trabalho

A utilização de materiais lenhocelulósicos para produção de bioetanol é um processo cujo interesse tem vindo a aumentar, o que se deve ao facto de este processo permitir a utilização de fontes de biomassa residuais. Deste modo, utilizando resíduos florestais, agrícolas, alimentares ou outros que sejam constituídos por biomassa lenhocelulósica, este material é valorizado, para produção de energia renovável. Por outro lado, a utilização destes materiais residuais também permite a redução da utilização de culturas alimentares para produção de etanol, sendo neste caso considerado um biocombustível de segunda geração.

Um dos principais problemas com a utilização deste tipo de biomassa para produção de bioetanol prende-se com a necessidade de ser previamente processada (pré-tratamento) de forma a poder ser fermentada. Contudo, esse processamento induz a formação de compostos inibidores dos microrganismos que são utilizados na produção do bioetanol. Assim, torna-se crucial a obtenção de informação que permita avaliar o desempenho dos microrganismos durante a fermentação de forma a evitar-se situações de stresse para as populações de células de levedura que participam no processo de fermentação, o que pode diminuir o rendimento do processo.

Este trabalho teve como objectivo monitorizar e caracterizar o crescimento da levedura *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 6269, bem como a sua capacidade de produção de bioetanol, em resposta à presença de ácido fórmico, um composto que está geralmente presente nos hidrolisados dos materiais lenhocelulósicos.

Com esse intuito, foram realizados vários ensaios de fermentação com este microrganismo em presença de concentrações crescentes de ácido fórmico, que foram monitorizadas por determinação do valor de pH e das concentrações de biomassa, glucose consumida e etanol produzido. Foram também realizadas análises de citometria de fluxo multiparamétrica, que permitiram avaliar o estado fisiológico das células da levedura, caracterizando a presença de espécies reactivas de oxigénio (ROS), a integridade da membrana citoplasmática e o potencial da membrana mitocondrial.

2 Introdução

O rápido crescimento industrial, de serviços e agricultura e o crescimento populacional de alguns países têm contribuído para o aumento do consumo de energia ao nível mundial. A maior parte da energia consumida mundialmente é ainda fornecida maioritariamente pelas fontes convencionais como carvão, petróleo e gás natural. A utilização destas fontes para produção de energia constitui dois grandes problemas, relacionados com o esgotamento dos combustíveis fósseis e a deterioração ambiental. Uma das grandes desvantagens da produção de energia através de combustíveis fósseis é a emissão de gases poluentes como a emissão de dióxido de enxofre (SO_2) que é uma das principais causas das chuvas ácidas. A nível global, a utilização dos combustíveis fósseis faz aumentar também as concentrações de gases com efeito de estufa como o dióxido de carbono (CO_2), representando um sério contributo para o aquecimento global e para as alterações climáticas. Torna-se assim imperativa a aposta nos processos de produção de energia a partir de fontes renováveis de modo a atenuar a gravidade destes dois problemas (Mussatto *et al.*, 2010).

Cerca de 98% (IEEB, 2008) do sector europeu dos transportes depende de combustíveis fósseis, sendo a maior parte das emissões de CO_2 proveniente deste sector. Deste modo, na perspectiva de responder às mudanças do sector energético, no sentido de apostar em fontes de energia renováveis, surgem os biocombustíveis.

A definição de biocombustíveis inclui combustíveis líquidos, sólidos ou gasosos cuja origem reside na transformação de biomassa através de vários processos (Martin *et al.*, 2011).

O bioetanol é um dos biocombustíveis mais interessantes do ponto de vista energético, podendo ser facilmente produzido à escala industrial. As fontes de produção de bioetanol podem ser materiais que contenham açúcares simples, amido ou substratos mais complexos como os compostos lenhocelulósicos.

2.1 Biocombustíveis de 2ª geração – bioetanol

2.1.1 Bioetanol

O bioetanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) é um álcool que pode ser obtido a partir da fermentação de açúcares simples, por acção microbiana. Trata-se de um líquido incolor com cheiro característico, volátil, inflamável e solúvel em água que pode ser utilizado directamente como combustível em diversas aplicações, ou em mistura com a gasolina, viável para alimentação de veículos com motores de combustão interna ou Flex (*Flexible fuel vehicles*). O etanol apresenta algumas vantagens quando comparado com a gasolina pois tem um maior índice de octano, e um calor latente de vaporização superior, o que se traduz numa maior eficiência energética (Balata *et al.*, 2008). Para além disso, a queima de bioetanol em substituição da gasolina, reduz as emissões de CO_2 em mais de 80%, eliminando totalmente a libertação de SO_2 (Mussatto *et al.*, 2010).

A produção e utilização de bioetanol como combustível tem aumentado globalmente, desde o estabelecimento da crise petrolífera de 1970. O mercado de bioetanol aumentou de uma produção de menos de 1000 milhões de litros em 1975 para uma produção de 39 000 milhões de litros em 2006, esperando-se um acréscimo até aos 100 000 milhões de litros em 2015 (Mussatto *et al.*, 2010). Na tabela 2.1 apresentam-se os valores de produção de bioetanol a nível mundial no ano de 2009.

Tabela 2.1 – Produção mundial de bioetanol em 2009, segundo *Biofuels Platform*, 2010.

País	Produção de bioetanol (*10 ⁶ L)	País	Produção de bioetanol (*10 ⁶ L)	País	Produção de bioetanol (*10 ⁶ L)
Estados Unidos	40130	Alemanha	750	Austrália	220
Brasil	24900	Espanha	465	Áustria	180
China	2050	Tailândia	401	Suécia	175
Canadá	1348	Índia	350	Polónia	166
França	1250	Colômbia	310	Hungria	150
		Outros	1110		
		Total	73954x10 ⁶ L		

É de notar que embora na Europa o bioetanol seja produzido e utilizado como biocombustível, em Portugal ainda não existe nenhuma unidade de produção.

A produção de bioetanol surgiu, inicialmente, a partir de culturas alimentares, como a cana-de-açúcar ou o milho, enfrentando-se um problema crescente de competição não só em relação às áreas de terreno agrícola utilizadas para o desenvolvimento de culturas alimentares, como também em relação à própria cultura. Esta polémica, veio contribuir para o desenvolvimento de novas tecnologias de produção de bioetanol a partir de outras fontes, com vista a diminuir a competição entre os sectores alimentar e energético. Deste modo, da 1ª geração de bioetanol, produzido a partir de biomassa proveniente de culturas alimentares, passou-se para a produção de bioetanol de 2ª geração, utilizando-se como matéria-prima, biomassa constituída por resíduos de culturas alimentares, culturas energéticas (Cardo- *Cynara cardunculus*, Sorgo sacarino- *Sorghum bicolor*, Cana-do-Reino- *Arundo donax L.*, etc.), resíduos de explorações florestais, entre outros, sendo todos eles compostos por materiais lenhocelulósicos (Talebnia *et al.*, 2010).

2.1.2 Biomassa lenhocelulósica

Os materiais lenhocelulósicos são compostos ricos em lenhina, celulose e hemicelulose e incluem materiais vegetais de diferentes estruturas, podendo variar desde madeiras, cascas e resíduos florestais em geral, a palhas e outros materiais (Maris *et al.*, 2006). Este tipo de biomassa constitui matéria-prima interessante para a produção de energia, evitando a competição com biomassa proveniente de culturas alimentares.

A composição química dos materiais lenhocelulósicos depende das características da parede celular dos elementos que os compõem. As paredes celulares desses elementos podem ser compostas por macromoléculas e compostos de massa molecular reduzida. As macromoléculas que são as lenhinas, a celulose e a hemicelulose, definem a forma e a estrutura das paredes celulares representando cerca de 95% da composição química total dos compostos lenhocelulósicos. Os compostos de massa molecular reduzida, extractivos, compõem os restantes 5% e são responsáveis pelas funções acessórias (Diniz, 2008).

As lenhinas (figura 2.1) constituem cerca de 20-45% da massa seca dos materiais lenhocelulósicos e são polímeros aromáticos mononucleares existentes na parede celular de alguns tipos de biomassa, como espécies lenhosas, que geralmente se

agregam às fibras de celulose formando complexos lenhocelulósicos. São responsáveis pela rigidez das paredes celulares, assegurando também a ligação entre as células (Diniz, 2008).

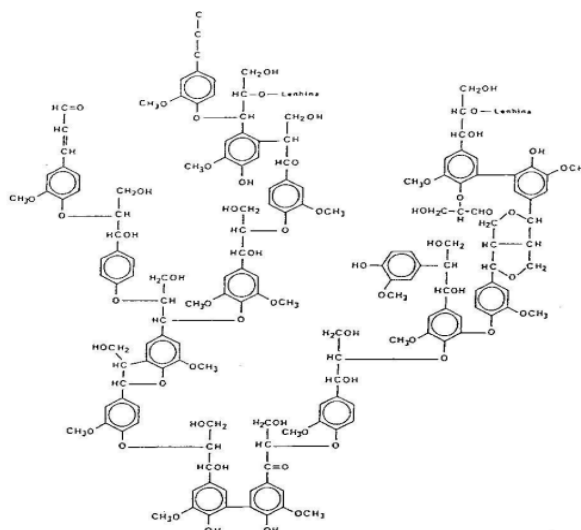


Figura 2.1 - Modelo estrutural de uma lenhina de madeira de resinosa (Fengel e Weneger, 1989).

Os polissacáridos correspondem a 60-80% do total da massa seca dos materiais lenhocelulósicos e incluem um polímero de elevada massa molecular, a celulose (figura 2.2), e uma mistura de polímeros de menor massa molecular, as hemiceluloses (figura 2.3). Organizam-se linearmente em feixes (microfibrilas) que são mantidos estruturalmente pela lenhina (Diniz, 2008).

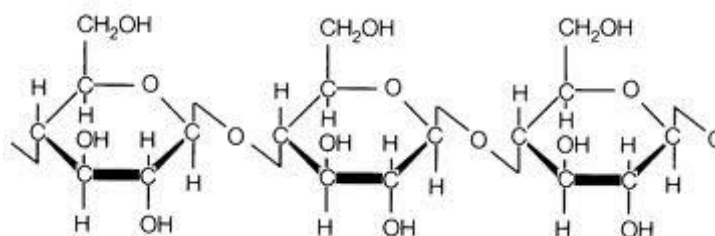


Figura 2.2 – Unidade estrutural da molécula de celulose (Fengel e Wegener, 1989)

As moléculas de celulose (figura 2.2) são constituídas por cadeias completamente lineares de D-glucose e têm forte tendência para formar pontes de hidrogénio inter e intramoleculares. Como consequência da estrutura fibrosa que forma, a celulose

possui alta resistência à tracção e é insolúvel na maioria dos solventes. Os grupos hidroxilos OH, são responsáveis pelo comportamento físico e químico da celulose, formando pontes de hidrogénio em função do seu posicionamento na cadeia molecular.

As hemiceluloses (figura 2.3) são cadeias de diversos polissacáridos, constituídos por unidades de açúcares do tipo pentose e/ou hexose (Diniz, 2008). Enquanto a celulose, contém exclusivamente D-glucose como unidade fundamental, as hemiceluloses são heteropolímeros em cuja composição podem aparecer, condensadas em proporções variadas, as seguintes unidades: xilose, manose, glucose, arabinose, galactose, ácido galacturónico, ácido glucorónico e ácido metilglucorónico.

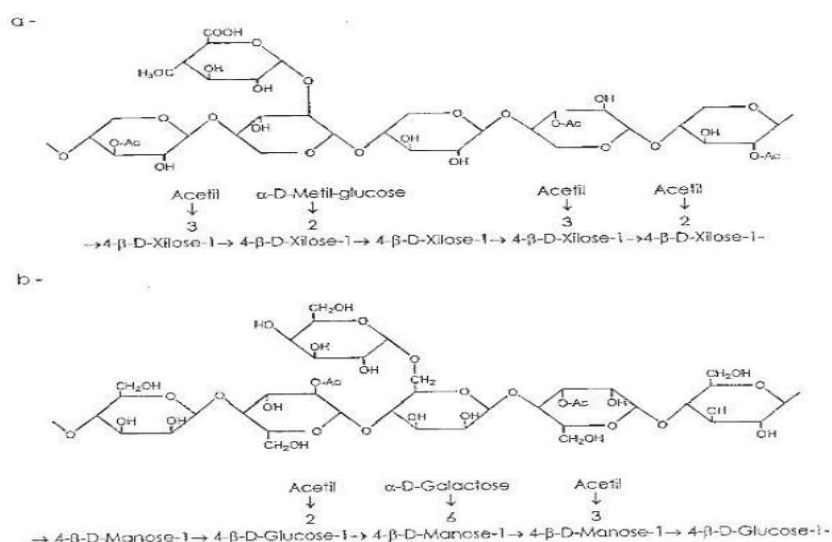


Figura 2.3- Estrutura dos principais tipos de hemiceluloses presentes nas madeiras de folhosas e resinosa (Fengel e Weneger, 1989).

Os compostos de massa molecular reduzida designados por extractivos, são uma mistura muito complexa de compostos com estrutura química muito diversa e que, numa madeira, podem incluir centenas de moléculas diferentes e de várias famílias químicas. Estes compostos são responsáveis por características como a cor, o cheiro e a resistência ao apodrecimento. Para se conseguir a sua extracção são utilizados solventes de diferentes polaridades, normalmente em sequência, começando com o de polaridade mais baixa até ao de polaridade mais alta. Uma sequência típica de extracção inclui os solventes diclorometano, etanol e água (Diniz, 2008).

A biomassa de origem lenhocelulósica é uma das mais importantes fontes de energia, contribuindo com cerca de 10-14% para a produção de energia a nível mundial (Saxena *et al.*, 2007).

Este tipo de biomassa pode ser utilizado de diversas formas para obtenção de energia. A maior parte da energia obtida a partir da biomassa é consumida em contexto doméstico e em indústrias que utilizam a madeira como matéria-prima.

A queima de resíduos lenhocelulósicos contribui para a emissão de poluentes e poeiras, incluindo gases que contribuem para a formação de chuvas ácidas (SO_2 , NO_2). No entanto, a quantidade de SO_2 produzida é 90% menor do que a quantidade produzida pela queima de carvão. Estes resíduos podem ser queimados através de combustão directa, produzindo vapor que faz movimentar uma turbina que converte a energia cinética gerada pelo movimento rotacional das turbinas em energia eléctrica. Existem também gaseificadores utilizados para converter este tipo de biomassa em combustível gasoso que conduzirá um ciclo combinado de gás-turbina de alta eficiência. Mais recentemente, foram também registados casos de sucesso de obtenção de biohidrogénio a partir de processos de fermentação no escuro (a partir da acção bacteriológica), combinados com processos de gaseificação (Saxena *et al.*, 2007).

Os resíduos lenhocelulósicos podem também constituir matéria-prima interessante para a produção de combustíveis líquidos através de processos de fermentação.

2.1.3 Produção de etanol a partir de materiais lenhocelulósicos

A produção de bioetanol, a partir de resíduos lenhocelulósicos, inicia-se com o pré-tratamento do material, que segue posteriormente para a hidrólise, obtendo-se desta forma os açúcares simples que poderão ser fermentados de modo a obter bioetanol, por acção de microrganismos (figura 2.4) (Talebnia *et al.*, 2010).

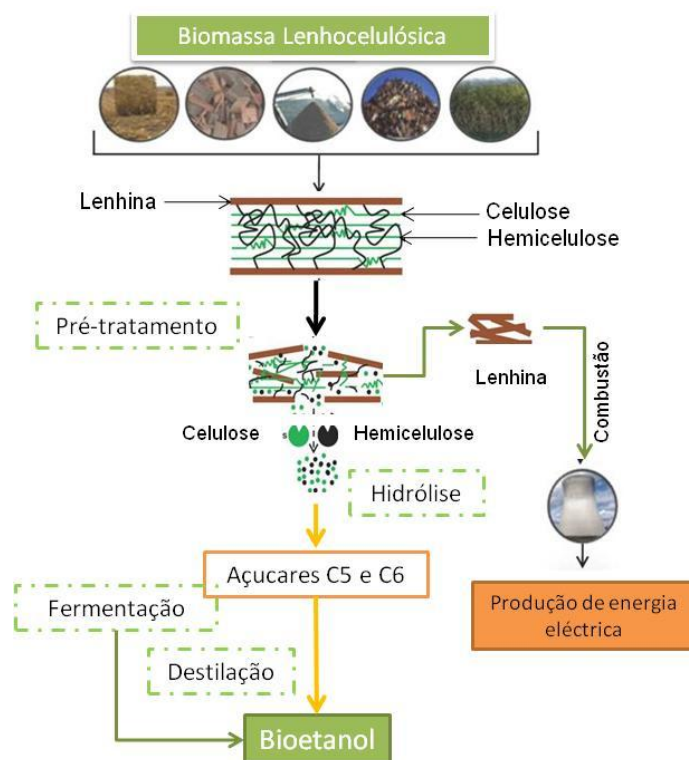


Figura 2.4-Esquema representativo da produção de bioetanol a partir de resíduos lenhocelulósicos (adaptado de: <http://www.biolsci.org/v05p0578.htm>).

→ Pré-tratamento

De forma geral, a primeira etapa do processo de pré-tratamento consiste na preparação do material lenhocelulósico de modo a torná-lo acessível à fermentação. Começa pelo processamento mecânico da matéria-prima, que visa a limpeza e a trituração do material, a fim de causar a destruição da estrutura da lenhina e tornar a matéria mais acessível aos tratamentos químicos ou biológicos posteriores. Depois da trituração, o material de dimensões reduzidas pode ser submetido a tratamento térmico (por exemplo explosão a vapor), levando à desintegração da parede celular, libertação da celulose e solubilização da hemicelulose. Posteriormente, o material segue para o processamento químico que poderá passar pela adição de uma base (geralmente NaOH) que permite a remoção da lenhina. Opcionalmente podem ser utilizados processos biológicos como a utilização de fungos para deslenhificação do material, sendo estes bastante mais demorados. Neste ponto, o material está preparado para seguir para a fase de hidrólise (Saxena *et al.*, 2007).

→ Hidrólise

Após o pré-tratamento, os polissacáridos das hemiceluloses encontram-se solubilizados e a celulose está disponível para ser hidrolisada. O processo de hidrólise tem como objectivo a transformação destes elementos em monossacáridos e dissacáridos (açúcares fermentescíveis).

A hidrólise do material lenhocelulósico pode ser catalizada por enzimas (celulases), hidrólise enzimática ou pela adição de ácido (diluído ou concentrado), hidrólise ácida diluída ou hidrólise ácida concentrada (Palmqvist *et al.*, 2000).

A degradação ácida da hemicelulose resulta na libertação de ácido acético, xilose, arabinose, manose, galactose e glucose, enquanto que a hidrólise da celulose resulta na libertação da glucose. A elevada pressão e temperatura, na presença de ácido, as pentoses, xilose e arabinose, podem ser convertidas em furfural. Do mesmo modo, a degradação das hexoses pode dar origem à formação de 5-hidroximetilfurfural (HMF). A quebra de moléculas de HMF, a partir dos mecanismos de hidrólise, origina a formação de ácido fórmico e ácido levulínico (Palmqvist *et al.*, 2000).

→ Fermentação

É um processo de conversão de açúcares por acção de leveduras em condições anaeróbias que conduz à produção de bioetanol.

A fermentação é um processo bioquímico que ocorre em diferentes fases. A primeira fase termina após transformação da glucose em gliceraldeído-3-fosfato, com consumo de duas moléculas de trifosfato de adenosina (ATP) e formação de difosfato de adenosina (ADP). Na segunda fase ocorrem as reacções de oxi-redução, com formação de piruvato e libertação das moléculas de fosfato, que se encontravam sob a forma inicial de ATP. Após a formação do piruvato ocorre uma terceira fase na qual o piruvato é descarboxilado, por acção enzimática, em acetaldeído e dióxido de carbono, sendo o acetaldeído reduzido a etanol na presença da enzima desidrogenase e de NADH (Saxena *et al.*, 2007).

Vários estudos têm referido o aumento da pressão osmótica e a inibição de processos de fermentação alcoólica por elevadas concentrações de etanol como as principais fontes de stresse para as leveduras produtoras de bioetanol. As elevadas concentrações de etanol, não só impedem o crescimento celular, como também

reprimem o transporte de glucose (Zhao *et al.*, 2009). No entanto, existem outros factores que também contribuem para o aumento do stresse das populações de leveduras. Tal como foi referido anteriormente (secção 2.1.2), um aumento de temperatura e pressão em condições acídicas, na fase de hidrólise de materiais lenhocelulósicos, pode dar origem à degradação dos açúcares com formação de ácidos fracos (fórmico e levulínico) que poderão inibir a produção de etanol na fase de fermentação (Palmqvist *et al.*, 2007).

Os ácidos fracos inibem o crescimento celular, e reduzem o rendimento da produção de bioetanol. Estes compostos são lipossolúveis, sendo capazes de se difundir através da membrana plasmática. Sendo o pH intracelular mais elevado, estes ácidos dissociam-se no interior da célula, até se atingir um estado de equilíbrio, provocando uma diminuição do pH no citosol. O decréscimo do pH, é compensado pela ATPase da membrana plasmática, que bombeia protões para o exterior, à custa da hidrólise do ATP. Consequentemente, o ATP disponível para a reprodução de células diminui, o que implica a diminuição da quantidade de biomassa produzida (Almeida *et al.*, 2007, Palmqvist *et al.*, 2000). Na presença de baixas concentrações destes ácidos, a produção de etanol pode até aumentar, verificando-se em certos casos, que estas baixas concentrações são capazes de estimular os níveis de produção de ATP, característicos do sistema de produção de etanol em condições anaeróbias. Para concentrações mais elevadas, a quantidade de ATP exigida é tão elevada que as células não conseguem evitar a acidificação do citosol.

Esta teoria justifica o facto do ácido fórmico ter um efeito mais inibidor do que o ácido levulínico, que por sua vez tem um efeito mais inibidor do que o ácido acético. O valor do pKa do ácido fórmico (3,75) é mais baixo do que o valor do pKa dos restantes ácidos referidos (4,64 e 4,76 respectivamente), portanto, a sua forma dissociada encontra-se em maior concentração, sendo mais tóxico para as células. O efeito inibidor superior do ácido fórmico está também associado ao seu tamanho molecular que, sendo mais reduzido, facilita a sua difusão através da membrana plasmática. Já o efeito inibidor do ácido levulínico, poderá estar mais associado ao facto de se tratar de um ácido com elevada hidrofobicidade, o que facilita a sua penetração na membrana celular (Almeida *et al.*, 2007).

De realçar que a um nível industrial, as leveduras utilizadas são escolhidas pela resposta que apresentam a situações de stresse, sendo preferidas as que mostram maior capacidade de resistência, mantendo os níveis de produção de bioetanol (Zhao *et al.*, 2009).

2.2 Citometria de fluxo multiparamétrica

A citometria de fluxo multiparamétrica é uma técnica de contagem e análise de partículas microscópicas, que são ressuspensas numa solução salina sendo conduzidas através de um sistema fluídico para serem detectadas por um sistema óptico e analisadas por um sistema electrónico. O sistema óptico é constituído por uma fonte de radiação laser, de comprimento de onda igual a 488 nm, no caso do citómetro utilizado neste trabalho, que intersecta a câmara de fluxo onde passa a suspensão celular, tal como se encontra esquematizado na figura 2.5.. O feixe de radiação é captado por vários detectores que constituem o sistema óptico: um encontra-se posicionado frontalmente em relação ao feixe de luz, *Forward Angle Light Scatter* (FSC), e pode dar informação sobre tamanho/dimensão de cada indivíduo, e o outro, o detector *Side Scatter* (SSC), encontra-se a 90° em relação ao laser e pode dar informação sobre a complexidade/granularidade interna das células, a partir da medida da dispersão da luz através dos organelos, núcleo, cromossomas e outras partículas presentes no meio intracelular. Quando se adicionam corantes à suspensão celular, as partículas coradas são excitadas pelo feixe de luz, sendo identificadas pelo sistema óptico que inclui unidades de filtros ópticos que fazem a selecção de um intervalo de comprimento de onda específico, sendo o dispositivo de recolha formado por vários espelhos dicróicos e filtros. Estes espelhos e filtros (figura 2.5), seleccionam os comprimentos de onda da radiação emitida pelas moléculas dos corantes quando são excitadas pela radiação laser, e dirigem-na para os detectores que medem a amplitude e a fluorescência da radiação a vários comprimentos de onda (FL1, FL2, FL3 etc.) (Andrade, 2010).

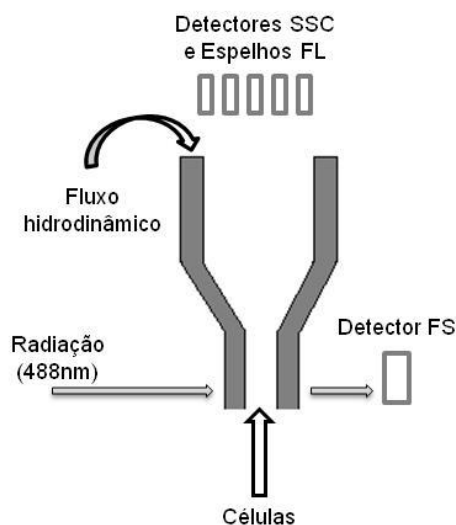


Figura 2.5- Esquema representativo do sistema de detecção do citómetro de fluxo.

Os sinais ópticos são então convertidos em sinais electrónicos digitais, obtendo-se dados em relação ao tamanho/dimensão das células, à complexidade, à integridade da membrana, ao estado das células, etc. O *software* utilizado para processar os dados do citómetro, permite a recolha informática destes dados, organizando-os em gráficos, de acordo com as leituras feitas em relação aos indivíduos da população (Andrade, 2010).

A vantagem da utilização da citometria de fluxo multiparamétrica reside no facto de ser possível definir o estado fisiológico individual das células, indo além da análise geral da população, obtida através de métodos tradicionais como a leitura de absorvância que fornece apenas o valor médio característico da população. Para além disso, este tipo de análise permite a avaliação de várias centenas de células por segundo, permitindo a recolha de resultados estatísticos válidos em relação aos indivíduos de uma população (Attfield *et al.*, 2000).

A utilização de misturas de corantes fluorescentes, permite avaliar o estado das células individualmente. Por exemplo, é possível analisar o estado da membrana citoplasmática, que uma vez danificada ou despolarizada permite a entrada de corante através da membrana. O uso de corantes em análises de citometria permite ainda detectar alterações em vários outros compartimentos da célula, sendo seleccionado o corante consoante o objectivo da análise (Silva *et al.*, 2008).

No presente trabalho, a recolha destes dados permitiu avaliar o estado das células de *Saccharomyces carlsbergensis* nos diferentes estádios de crescimento, na presença de crescentes concentrações de ácido fórmico, como agente inibidor.

→Utilização da citometria de fluxo multiparamétrica na monitorização das fermentações alcoólicas

As leveduras constituem um grupo de microrganismos unicelulares pertencentes ao reino *Fungi*, que se reproduzem sexuada e assexuadamente e são capazes de desenvolver o processo de fermentação alcoólica em anaerobiose. Estes microrganismos unicelulares consomem relativamente poucos nutrientes, dividem-se rapidamente e possuem capacidade de adaptação a diferentes meios pelo que são utilizados maioritariamente na Indústria Alimentar, nas áreas da panificação e da produção de bebidas alcoólicas.

A citometria de fluxo multiparamétrica é uma técnica que poderá ser usada para uma monitorização em tempo real de qualquer destes processos industriais, permitindo tomar decisões para ajustar condições de operação no decorrer do processo.

Nas leveduras, a membrana citoplasmática, é composta essencialmente por fosfolípidos, proteínas e ergosteróis. Essa membrana é revestida por um invólucro protector denominado parede celular que é constituída por polissacáridos (quitina e glucano). O meio intracelular é composto por vários organitos, localizados no citoplasma, entre os quais o núcleo, onde se encontra o património genético da célula sob a forma de moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA). No citoplasma são sintetizadas todas as moléculas que permitem o crescimento, multiplicação da célula e a comunicação com outros organismos. A membrana citoplasmática tem como principal função a protecção do meio intracelular onde decorrem todas as reacções metabólicas da célula, como tal, a manutenção da sua integridade é de extrema importância para a viabilidade celular. A integridade da membrana pode ser analisada através de citometria de fluxo multiparamétrica, utilizando o corante Iodeto de Propídio (PI) que, por não ser capaz de atravessar uma membrana intacta, se acumula nas células danificadas ou mortas, agregando-se ao DNA e emitindo fluorescência (Silva *et al.*, 2005a e Attfield *et al.*, 2008).

No meio intracelular das leveduras estão localizadas as mitocôndrias, que fornecem a energia necessária para as reacções metabólicas da célula. Para armazenar e utilizar a energia as mitocôndrias criam gradientes electroquímicos de protões entre dois compartimentos separados por uma membrana, através da respiração celular. Estes gradientes permitem a degradação de açúcares, com formação de dióxido de carbono. Nestas reacções ocorre transferência de electrões de um estado de alta energia para um estado de baixa energia, libertando-se energia para o sistema. Esta energia é utilizada para bombear protões através das membranas internas dando origem a um gradiente electroquímico (potencial de membrana). Quando os protões voltam a atravessar a membrana no sentido inverso, activam a enzima ATPsintetase que utiliza a energia do fluxo de protões para sintetizar trifosfato de adenosina (ATP). Deste modo, o potencial de membrana constitui um elemento fundamental para a produção de energia necessária ao metabolismo da célula (Ferreira e Sousa, 1998) e pode ser monitorizado a partir de citometria de fluxo multiparamétrica, através da utilização de corantes como o ácido Bis-(1,3-dibutilbarbitúrico) pentametino oxonol (Box) ou a 3,3'-dihexiloxacarbocianina (DiOC₆(3)). As células com elevado potencial de membrana são hiperpolarizadas e as que têm baixo potencial ou valores nulos são despolarizadas. O corante entra nas células despolarizadas ou nas células polarizadas

(dependendo da carga do corante) agregando-se às proteínas do meio intracelular ou da membrana e emite fluorescência (Lloyd *et al.*, 1995, Kobayachi *et al.*, 2006).

Um outro factor a ter em conta relativamente ao metabolismo das células de levedura, diz respeito à produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS), geradas a partir dos mecanismos de respiração na mitocôndria. A produção de ROS está associada a metabolismos aeróbios. Contudo, estudos recentes provam que também há formação de ROS em processos anaeróbios de fermentação. Sendo um produto do próprio metabolismo, há que ter em conta que a acumulação de ROS pode danificar os ácidos nucleicos, prejudicando também os mecanismos de defesa das células e, como tal, trata-se de um pãrametro que é importante analisar para avaliação do estado das células (Landolfo *et al.*, 2008). O composto não fluorescente 123-dihidrorodamina atravessa a membrana celular, sendo oxidada por ROS e transformando-se em 123-rodamina, que tem capacidade de emitir fluorescência (Kobayachi *et al.*, 2006).

A monitorização das fermentações alcoólicas através de Citometria de fluxo multiparamétrica, no presente trabalho incidiu essencialmente sobre a análise da permeabilidade da membrana citoplasmática, potencial da mesma, bem como da avaliação da presença de espécies reactivas de oxigénio (ROS).

3 Materiais e métodos

3.1 Microrganismo

Para o trabalho realizado usou-se a levedura *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 6269. A levedura foi mantida em rampas com meio de repicagem MR (tabela 3.1) incubadas em estufa (Memmert, Alemanha) a 30°C durante 2 dias e posteriormente armazenadas em ambiente refrigerado a 4°C.

Tabela 3.1 - Composição do meio de repicagem.

Constituintes	Concentração (g.L ⁻¹)
Glucose	20
Extracto de levedura	5
Peptona	10
Agar	20

3.2 Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho encontram-se listados na tabela 0.1 no Anexo I.

3.3 Meios de crescimento e fermentação

Na tabela 3.2, encontra-se descrita a composição do meio utilizado para o crescimento de pré-inóculos e para os ensaios de fermentação.

Tabela 3.2 - Composição do meio utilizado nos ensaios de crescimento e fermentação.

Constituintes	Concentração (g.L ⁻¹)
Extracto de Levedura	5
Sulfato de Amónio	5
Dihidrogenofosfato de Potássio	5
Sulfato de Magnésio	1
Heptahidratado	
Glucose	50

A solução de glucose foi adicionada ao restante meio após a esterilização de ambas as soluções em separado, em autoclave (Uniclave 88, A J Costa, Portugal) a 110°C durante 15 min.

No estudo do efeito inibidor na presença de ácido fórmico, foram também adicionadas ao meio quantidades deste composto a variar entre 0,5 g.L⁻¹ e 20 g.L⁻¹ e, antes da esterilização, a solução de meio com inibidor foi submetida a acerto de pH a 5, com adição de hidróxido de sódio (NaOH), utilizando um medidor de pH inoLab pH 730 da WTW, Weilheim, Alemanha.

3.4 Fermentação alcoólica em presença de ácido fórmico

3.4.1 Crescimento da levedura

De forma a estudar o crescimento da levedura, realizaram-se ensaios prévios em *Erlenmeyers* de 1 L, com 500 mL de meio MC (secção 3.3), tapados com rolhas de algodão. Em cada foram inoculadas três ansadas de levedura a partir de rampas. Os meios foram incubados (Incubadora Infors Unitrom da Infors, Basileia, Suíça) a 30°C com agitação orbital de 150 rpm. Para caracterizar o crescimento foram realizadas amostragens à chama, com intervalos de 1h, e efectuadas leituras espectrofotométricas (Thermo Spectronic Genesys 20, Thermo Scientific, E.U.A.) de absorvância da suspensão a 640 nm (A_{640nm}).

3.4.2 Fermentações

Os ensaios de fermentação, foram realizados em *Erlenmeyers* de 1 L contendo 500 mL de meio MC (secção 3.3.), cuja composição incluía glucose como fonte de carbono e diferentes concentrações de ácido fórmico (consoante o ensaio a decorrer). Os meios foram inoculados com levedura *Saccharomyces carlsbergensis* proveniente de um crescimento em fase exponencial de crescimento ($t=14h$). A levedura foi concentrada por centrifugação (centrífuga refrigerada Biofuge 28 RS, Heraeus Sepatech, Alemanha) a 13500 rpm, durante 10 min, lavada com água destilada esterilizada, e centrifugada novamente. No final foi suspensa em água destilada esterilizada de modo a inocular o meio de fermentação com uma concentração final de células de 150 mg.L^{-1} , por adição de 5 mL de suspensão concentrada.

Os *Erlenmeyers* contendo meio e levedura, tapados com rolhas de borracha perfuradas por agulha, para permitir o escoamento de gases formados durante a fermentação, foram incubados a 30°C sob agitação orbital de 150 rpm (Unitrom, Infors, Suíça).

Foram realizadas amostragens a intervalos de tempo regulares durante o desenvolvimento da fermentação, à chama, fazendo-se de imediato a leitura da absorvância de cada amostra a 640 nm em espectrofotómetro (Thermo Spectronic Genesys 20, Thermo Scientific, E.U.A.). Parte da suspensão foi separada para caracterização por citometria de fluxo (secção 3.5) e o restante foi seguidamente centrifugado, durante 30 min a 5000 rpm numa centrífuga Sigma 201 da Sigma, Osterode am Harz, Alemanha, utilizando microtubos de 1,5 mL. No sobrenadante foi medido o pH e as concentrações em glucose (secção 3.6.2.), etanol (secção 3.6.3.) e ácido fórmico (secção 3.6.4.).

Paralelamente a cada ensaio na presença de ácido fórmico, realizou-se um ensaio sem adição de inibidor para servir de controlo que foi preparado, inoculado e monitorizado de modo similar.

3.5 Caracterização do estado de viabilidade das células de levedura por citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi utilizada para monitorizar a resposta de stresse das células de *S. carlsbergensis* na presença do ácido fórmico. Avaliou-se a integridade da

membrana citoplasmática, o potencial das membranas mitocondrial e citoplasmática, e a formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS). Os ensaios de citometria de fluxo multiparamétrica foram realizados num citómetro FACScan, Becton Dickinson Instruments, Bélgica.

Procederam-se a alguns ensaios preliminares de forma a seleccionar os corantes adequados à monitorização da resposta de stresse da levedura.

De modo a avaliar a integridade da membrana citoplasmática, utilizou-se uma solução-mãe com 1 mg.L^{-1} de iodeto de propídio (PI) (Invitrogen, E.U.A.). A partir dessa solução foi preparada uma diluição em água destilada, resultando uma solução com concentração final de $5 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Para a avaliação do potencial de membrana, foi utilizado o corante iodeto de 3,3'-dihexiloxacarbocianina ($\text{DiOC}_6(3)$) (Invitrogen, E.U.A.), com concentração da solução-mãe de $10 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Foi adaptado o método de dupla coloração sugerido por Lloyd *et al.*, 1995, utilizando em simultâneo PI e $\text{DiOC}_6(3)$. Com o objectivo de se obterem entre 800 e 1000 eventos por segundo, as amostras foram diluídas numa solução salina (PBS) (Oxoid, Inglaterra), perfazendo um volume de $500 \text{ } \mu\text{L}$. Às amostras foram posteriormente adicionados $0,5 \text{ } \mu\text{L}$ de PI e $0,5 \text{ } \mu\text{L}$ de $\text{DiOC}_6(3)$, seguindo-se um período de incubação no escuro de 10 min, à temperatura ambiente. A fluorescência das células coradas com PI foi lida em FL3 e a fluorescência das células coradas com $\text{DiOC}_6(3)$ foi lida em FL1 (secção 2.3.).

As espécies reactivas de oxigénio (ROS) foram analisadas através da utilização de uma solução de 123-DHR de 1 mM . Dessa solução foram diluídos 5 mL em solução salina (PBS), perfazendo um volume de 50 mL . Esta solução foi posteriormente diluída em sulfóxido de dimetilo (DMSO) resultando uma solução de concentração $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, que foi armazenada a -18°C . Depois de proceder ao acerto do número de eventos pretendido (800-1000 eventos por segundo), diluindo as amostras em PBS até um volume de $500 \text{ } \mu\text{L}$, foram adicionados $20 \text{ } \mu\text{L}$ da solução de 123-DHR, adaptando o método sugerido por Kobayashi *et al.*, 2007. A fluorescência das células coradas com 123-rodamina foi lida em FL1 (secção 2.3.).

Previamente efectuou-se também uma análise de autofluorescência, fazendo leituras no citómetro com cada solução de células diluídas em PBS sem corantes. Além disso,

entre leituras de suspensões com corante foram efectuadas lavagens do equipamento, seguindo o protocolo de utilização do citómetro.

As amostras de células recolhidas foram previamente tratadas com ultra-sons (Transonic 660/H, Elma, Bélgica), durante 10 s de modo a proporcionar a desagregação das células da levedura. Após a adição dos corantes, procedeu-se à homogeneização das amostras, utilizando-se um agitador vórtex (MS2 Minishaker, IKA, E.U.A.).

Foram feitos ainda ensaios preliminares para optimização técnica de métodos, utilizando DiOC₆(3), dissolvido em DMSO para obter soluções com 10 µg.mL⁻¹, que foram posteriormente armazenadas a -18°C. Com o objectivo de apurar se o corante respondia a alterações do potencial de membrana, induziu-se o colapso do potencial da membrana, através da adição de 10 µL uma solução 15 µg.mL⁻¹ de cianina carbonil m-clorofenilhidrazona (CCCP).

De forma a estudar o comportamento dos corantes em presença de células mortas, foi adicionado etanol 70% (v.v⁻¹) a uma suspensão celular, incubando durante 40 min. Seguindo o protocolo sugerido por Landolfo *et al.*, 2008, a suspensão celular foi lavada duas vezes com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), recorrendo à centrifugação durante 15 min a 5000 rpm (Sigma 201 da Sigma, Osterode am Harz, Alemanha) para separar o *pellet*. Procedeu-se posteriormente ao acerto de absorvância a 7-12, por diluição com EDTA. Fizeram-se as leituras no citómetro, analisando a suspensão com células mortas com adição de diferentes volumes de DHR e DiOC₆(3).

3.6 Métodos analíticos

3.6.1 Determinação da relação absorvância_{640nm} versus concentração de biomassa seca para culturas de *S. carlsbergensis*

De um crescimento com 50 g.L⁻¹ de glucose em final da fase exponencial foram recolhidas células que foram concentradas por centrifugação durante 10 min a 13500 rpm numa centrífuga Biofuge 28 RS, Heraeus Sepatech, Alemanha, sendo de seguida lavadas com água destilada esterilizada, para serem novamente centrifugadas de modo semelhante. No final da segunda centrifugação, as células foram ressuspendidas em água destilada esterilizada de modo a obter uma suspensão

celular com um valor de absorvância (**A**) a 640 nm de cerca de 5. Posteriormente, foram preparadas diluições com água a partir da suspensão concentrada, em balões volumétricos de 100 mL (1:10; 1:20; 1:30; 1:40; 1:60). Registaram-se os valores de absorvância de cada uma das soluções diluídas e procedeu-se de seguida à filtração em vácuo e em triplicado, de um volume de 5 mL da suspensão concentrada, utilizando filtros GF/C da Whatman (diâmetro de 47 mm). Os filtros foram posteriormente colocados em caixas de petri e secos em estufa (Memmert, Alemanha) a 80°C durante 24h e finalmente pesados. No final foi construída uma recta representando a relação entre a absorvância e a concentração da biomassa-seca que se encontra no Anexo II (figura 0.1).

3.6.2 Determinação colorimétrica da concentração de glucose

A concentração de glucose foi determinada por aplicação do método do reagente de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) (Miller, 1959).

A 0,5 mL de amostra devidamente diluída e em duplicado, foram adicionados 0,5 mL de reagente de DNS, em tubo de ensaio. Depois de homogeneizada a mistura em agitador (MS2 Minishaker, IKA, E.U.A.), os tubos de ensaio foram rolhados e mergulhados em banho de água a ferver durante 5 min após os quais foram retirados do banho e deixados arrefecer à temperatura ambiente durante 10 min. De seguida adicionaram-se 5 mL de água destilada a cada um dos tubos e, após homogeneização foi lido o valor da **A** a 540 nm (U-2000, HITACHI, Japão), de cada solução contra o de um teste branco em que se substituiu a amostra por água destilada.

A determinação da concentração de glucose nas amostras dos ensaios de fermentação foi obtida a partir de uma curva de calibração construída para concentrações na gama de 0,075 a 1,5 g.L⁻¹ de glucose.

3.6.3 Determinação da concentração de etanol por cromatografia gasosa

A concentração de etanol foi avaliada por cromatografia gasosa, tendo sido utilizado um cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 5890 equipado com injector *on-column*, uma coluna de enchimento (4% Carbowax 20 M, 1% de ácido trimesílico, 80-120 Carbowax BDA) de 2 m de comprimento e 1/8' de diâmetro interno e detector de

ionização à chama. As temperaturas do detector, injector e forno eram respectivamente de 200°C, 150°C e 110°C, tendo-se utilizado hélio como gás de arrastamento. O volume de injeção foi de 1 µL.

Antes da análise das amostras procedeu-se à calibração do equipamento usando uma solução de etanol com 1,5 g.L⁻¹. A todas as amostras, depois de devidamente diluídas, foi adicionado igual volume de solução de 2-propanol como padrão interno.

3.6.4 Determinação da concentração de ácido fórmico por HPLC

As concentrações de ácido fórmico presente nas amostras dos ensaios de fermentação em presença de inibidor foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) num equipamento Merck Hitachi, Alemanha, equipado com uma bomba (L-7100), um detector de índice de refração (La Chrom L-7490), um forno (L-73-50) e um injector automático (Merck, L72000), tendo sido utilizada uma coluna Aminex HPX-87H.

Foi injectado um volume de 5 µL de cada amostra e padrões, e a análise decorreu a um fluxo de 0,4 mL.min⁻¹, As amostras foram eluídas com uma solução de 5 mM de ácido sulfúrico filtrada, utilizando filtros com 0,2 µm de porosidade e diâmetro de 47 mm, de polietersulfona hidrofílica (Supoc 200 da Pall Life Sciences, E.U.A.).

A determinação da concentração de ácido fórmico nas amostras foi realizada a partir de uma curva de calibração construída usando diluições de uma solução padrão-mãe contendo ácido fórmico (20 g.L⁻¹).

3.7 Tratamento de resultados

3.7.1 Taxa específica de crescimento

Para cada ensaio de fermentação, foram calculadas as taxas específicas de crescimento da levedura *S. carlsbergensis*. Para isso, foram traçados os gráficos que traduzem o logaritmo natural da concentração de biomassa em função do tempo, de modo a visualizar os pontos integrantes da parte recta relativa à fase exponencial de

crescimento. Depois de identificados esses pontos, foi calculada a taxa específica de crescimento através do método de regressão linear:

$$(1)$$

A equação (1) representa a variação da concentração de biomassa com o tempo para o crescimento de um microrganismo, em que X é a concentração de biomassa (g.L^{-1}); X_0 é a concentração de biomassa inicial (g.L^{-1}); μ é a taxa específica de crescimento (h^{-1}); t é o tempo (h).

3.7.2 Rendimento de biomassa em função da glucose consumida ($Y_{X/\text{glu}}$)

O rendimento de biomassa em função da glucose consumida ($Y_{X/\text{glu}}$) foi calculado a partir do quociente entre a concentração máxima de biomassa produzida (excluindo a concentração de biomassa inoculada no tempo igual a zero) e a concentração de glucose consumida no intervalo de tempo em que se atingiu a concentração máxima de biomassa.

$$Y_{X/\text{glu}} = \frac{X_{\text{máx}} - X_0}{\text{glu}_{\text{consumida}}} \quad (2)$$

A equação (2) representa o rendimento de biomassa em função da glucose consumida (g.g^{-1}), em que $X_{\text{máx}}$ é a concentração máxima de biomassa; X_0 é a concentração inicial de biomassa e $\text{glu}_{\text{consumida}}$ é a concentração de glucose consumida no intervalo de tempo em que se atingiu a concentração máxima de biomassa.

3.7.3 Rendimento de etanol em função da glucose consumida ($Y_{\text{etOH}/\text{glu}}$)

O rendimento de etanol em função da glucose consumida foi calculado a partir do quociente entre a concentração máxima de etanol produzido e a concentração de glucose consumida no intervalo de tempo em que se atingiu a concentração máxima de etanol.

$$Y_{\text{etOH}/\text{glu}} = \frac{\text{etOH}_{\text{máx}}}{\text{glu}_{\text{consumida}}} \quad (3)$$

A equação (3), representa o rendimento de etanol em função da glucose consumida (g.g^{-1}), em que $\text{etOH}_{\text{máx}}$ é a concentração máxima de etanol produzida e $\text{glu}_{\text{consumida}}$ é concentração de glucose consumida no intervalo de tempo em que se atingiu a concentração máxima de etanol.

3.7.4 Constante de inibição do crescimento

O valor da constante de inibição para o crescimento foi calculado a partir do estabelecimento da relação entre os logaritmos naturais das taxas específicas de crescimento e a concentração de inibidor. De acordo com a equação (4), o valor da constante de inibição corresponde ao declive da recta obtida.

$$\ln(\mu_x) = K_i \cdot I_x + \ln(\mu_0) \quad (4)$$

A equação (4), representa a variação da taxa específica de crescimento com concentração de inibidor para culturas de levedura, em que K_i é a constante de inibição (L g^{-1}); μ_x é o a taxa específica de crescimento calculada para a concentração I_x de inibidor; I_x é a concentração de inibidor e μ_0 é a taxa específica de crescimento calculada para a concentração mais baixa de inibidor.

4 Resultados e discussão

4.1 Crescimento de inóculos de *Saccharomyces carlsbergensis*

No início deste trabalho, foi realizado um ensaio para caracterização do crescimento da levedura, de modo a possibilitar o traçado da curva de crescimento para identificar as fases de crescimento do microrganismo. O traçado da curva (figura 4.1) foi essencial para identificar a duração da fase exponencial durante a qual seria adequado proceder à colheita de células para inoculação dos ensaios de fermentação.

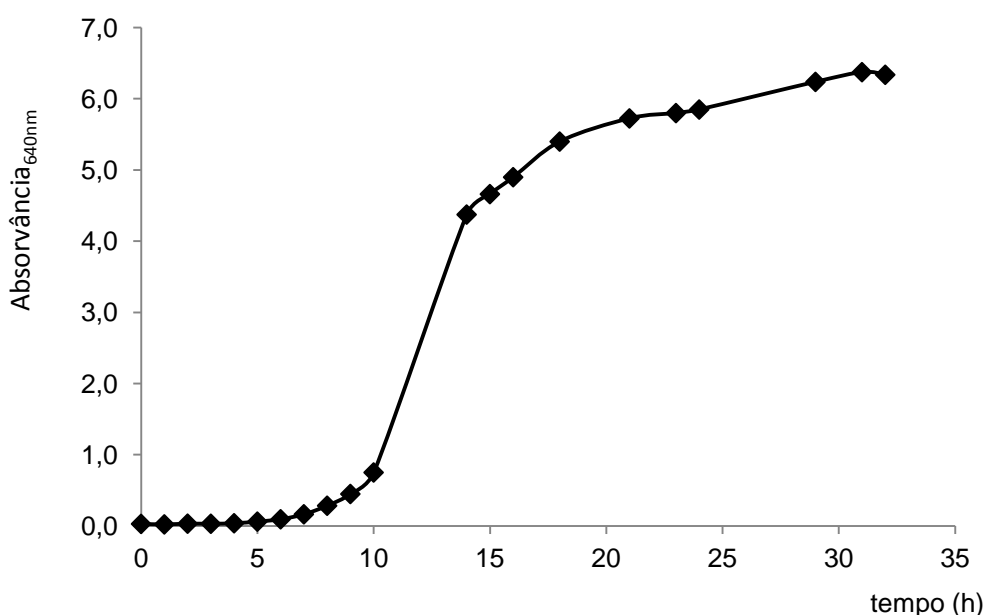


Figura 4.1 - Curva de crescimento da levedura *S. carlsbergensis* em meio MC com 50 g.L⁻¹ de glucose (T=30°C; 150 rpm)

Os valores de absorvância registados e que se podem observar na figura 4.1, foram posteriormente convertidos nos respectivos valores de quantidade de biomassa produzida a partir da recta aferida para a relação entre a absorvância a 640 nm (A_{640nm}) e a concentração de biomassa (Anexo II), calculando-se a taxa específica de crescimento ($\mu=0,466 \text{ h}^{-1}$; $R^2=0,997$) a partir do declive da recta que traduz a relação entre o logaritmo natural da quantidade de biomassa e o tempo, na fase exponencial do crescimento (secção 3.7.1.)

Em face destes resultados as células de levedura necessárias para os ensaios fermentativos foram sempre recolhidas entre as 12 e as 14 h de desenvolvimento do pré-inóculo, após inoculação por ansada.

4.2 Fermentação alcoólica em presença de ácido fórmico

4.2.1 Produção de biomassa

O principal objectivo deste trabalho foi a avaliação do efeito inibidor do ácido fórmico em ensaios de fermentação com 50 g.L^{-1} de glucose. As concentrações de inibidor testadas variaram entre 0 e 20 g.L^{-1} e, para cada ensaio, calcularam-se os valores de concentração de biomassa relativamente aos valores de absorvância registados ao longo do tempo, aplicando a recta apurada para a relação entre absorvância e a biomassa-seca (secção 3.6.1.; Anexo II). Os resultados obtidos estão expostos no gráfico da figura 4.2.

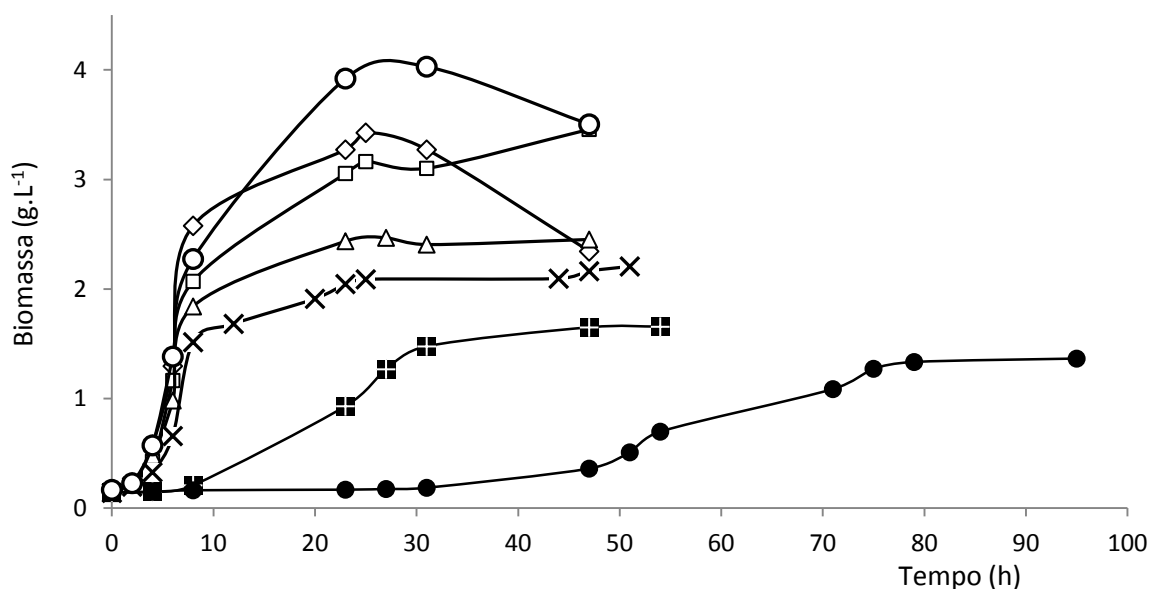


Figura 4.2- Efeito da concentração de ácido fórmico na produção de biomassa em ensaios de fermentação por *S. carlsbergensis* em meio MC com 50 g.L^{-1} de glucose: —○— 0 g.L^{-1} ; —◇— $0,5 \text{ g.L}^{-1}$; —□— 1 g.L^{-1} ; —△— 5 g.L^{-1} ; —×— 10 g.L^{-1} ; —■— 15 g.L^{-1} ; —●— 20 g.L^{-1} . ($T=30^{\circ}\text{C}$; 150 rpm). Os valores experimentais da concentração de biomassa são afectados por um erro experimental que não ultrapassa 10% ($n=2$).

Em face dos resultados obtidos, foi possível constatar que na presença de concentrações crescentes de ácido fórmico, a concentração máxima de biomassa produzida sofreu um decréscimo em relação à concentração de biomassa produzida no ensaio sem inibidor (figura 4.2; tabela 4.1). Nos ensaios com 5 g.L⁻¹ e 10 g.L⁻¹ de ácido fórmico verificou-se uma diferença acentuada (40% inferior) em relação aos valores de concentração de biomassa do ensaio sem ácido fórmico. Nos ensaios de 15 g.L⁻¹ e 20 g.L⁻¹, os valores máximos de concentração de biomassa caíram até cerca de 35% em relação ao valor máximo registado no ensaio sem inibidor.

Tabela 4.1- Tempo de duração de processo e valores de variáveis relacionados com a produção de biomassa em ensaios de fermentação por *S. carlsbergensis* em meio MC com 50 g.L⁻¹ de glucose e em presença de ácido fórmico (0 – sem inibidor).

Concentração de ácido fórmico (g.L ⁻¹)	t (h)	X _{máx} (g.L ⁻¹)	Y _{X/glu} (g.g ⁻¹)	Y _{X/glu} /Y _{X/glu0}
0	25	3,93	0,074	-
0,5	47	3,27	0,067	0,964
1	47	3,32	0,069	0,992
5	47	2,33	0,048	0,686
10	51	2,07	0,042	0,599
15	54	1,51	0,029	0,419
20	143	1,34	0,034	0,480

Relativamente aos valores de rendimento de biomassa em função da glucose consumida (secção 3.7.6.), foi possível observar também que tal como o valor da concentração máxima produzida, o valor decresce à medida que se aumenta a concentração de ácido fórmico adicionada ao meio, pois em todos os ensaios à excepção do com 20 g.L⁻¹ houve consumo total de glucose. Da mesma forma, os valores normalizados do rendimento de biomassa marcam um decréscimo à medida que se aumenta a concentração de inibidor, afastando-se da unidade, e para concentrações superiores a 15 g.L⁻¹ de ácido fórmico, o valor decresce para cerca de 40%. Os valores observados são inferiores aos descritos por Duarte, *et al*, (2005) que referem valores superiores, 0,80, para uma concentração de 4,5 g.L⁻¹, decrescendo até 0,73 para concentrações de ácido fórmico de 9 g.L⁻¹ em ensaios com 20 g.L⁻¹ de glucose e usando a levedura *Debaryomyces hansenii*.

Neste trabalho foram também calculadas as taxas específicas de crescimento (secção 3.7.1.) tendo em conta os dados recolhidos ao longo dos ensaios sem inibidor e com adição de diferentes concentrações de ácido fórmico e o quociente entre a taxa específica de crescimento dos ensaios com adição de inibidor e a taxa específica de crescimento do ensaio sem ácido fórmico que traduz o valor normalizado (tabela 4.2).

Tabela 4.2- Valores da taxa específica de crescimento em ensaios de fermentação por *S. carlsbergensis* em meio MC com 50 g.L⁻¹ de glucose e em presença de ácido fórmico (μ_0 – taxa específica de crescimento no ensaio sem inibidor).

Concentração de ácido fórmico (g.L ⁻¹)	(μ) h ⁻¹	(R ²)	μ/μ_0
0	0,451	0,999	1
0,5	0,428	0,998	0,951
1	0,412	0,992	0,913
5	0,362	0,998	0,803
10	0,192	0,998	0,425
15	0,097	0,999	0,217
20	0,093	0,996	0,208

Foi possível observar que a taxa específica de crescimento diminuiu à medida que aumentou a concentração de ácido fórmico, comprovando-se o seu efeito inibidor. Verificou-se que esse decréscimo foi mais acentuado, superior a 57%, para concentrações superiores a 10 g.L⁻¹ de ácido fórmico e menos importante (inferior a 9%) para concentrações abaixo de 1 g.L⁻¹ de inibidor. Tal como neste caso, também Duarte *et al*, (2005) referem, em ensaios com *Debaryomyces hansenii*, que este quociente apresenta valores de 0,47 para uma concentração de ácido fórmico de 9 g.L⁻¹. Para concentrações menores que 5 g.L⁻¹, os valores do quociente mantêm-se próximos de um, denotando-se um comportamento semelhante ao do ensaio sem inibidor, o que também foi observado pelos referidos autores que obtiveram valores entre 0,93 e 0,74 para concentrações de ácido fórmico de 1,5 g.L⁻¹ e 6 g.L⁻¹, respectivamente (Duarte *et al*, 2005).

Com base nos valores das taxas específicas de crescimento apuradas para os ensaios com as diferentes concentrações de inibidor calculou-se o valor da constante de inibição (3.7.4.) do crescimento (tabela 4.3).

Tabela 4.3 – Valor da constante de inibição (K_i) para o crescimento de *S. carlsbergensis* em ensaios de fermentação com 50 g.L⁻¹ de glucose e em presença de ácido fórmico

Constante de Inibição (K_i) (L.g ⁻¹)	Coeficiente de correlação (R^2)
0,13	0,999

O valor da constante de inibição obtido é ligeiramente mais elevado face à constante de inibição obtida para o ácido acético, nas mesmas condições de fermentação, de 0,12 L.g⁻¹ (Freitas, 2011). Segundo Larson *et al.*, 1999 e Duarte *et al.*, 2000, leveduras produtoras de etanol, como *S. cerevisiae*, toleram mais elevadas concentrações de ácido fórmico, embora o efeito inibidor da forma indissociada do ácido fórmico seja mais acentuado do que o efeito de inibição provocada pela forma indissociada de ácido acético.

Nos ensaios de fermentação por *S. carlsbergensis* fizeram-se também medições de pH de modo a avaliar o efeito das diferentes concentrações de ácido fórmico, partindo do momento inicial, em que o valor pH de cada ensaio com inibidor foi acertado com o pH do ensaio de controlo. Os resultados encontram-se expostos na figura 4.3.

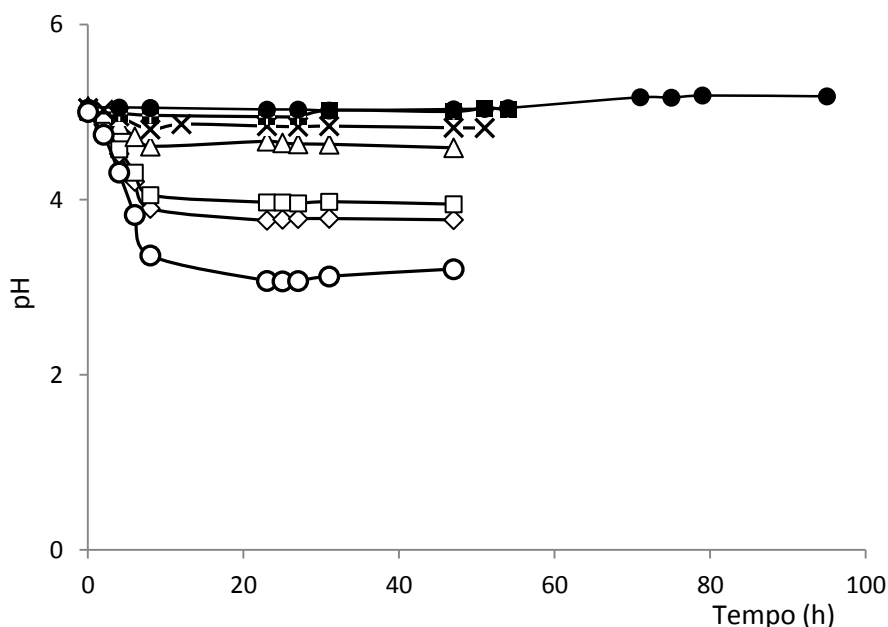


Figura 4.3 - Variação do pH ao longo de ensaios de fermentação com *S. carlsbergensis* em meio MC com 50 g.L⁻¹ de glucose em presença de ácido fórmico (T=30°C; 150 rpm): ○ 0 g.L⁻¹; ◇ 0,5 g.L⁻¹; □ 1 g.L⁻¹; △ 5 g.L⁻¹; × 10 g.L⁻¹; ■ 15 g.L⁻¹; ● 20 g.L⁻¹.

Verificou-se que nos ensaios com concentrações de ácido fórmico inferiores a 5 g.L^{-1} , o valor de pH ao longo do tempo decresce, à semelhança do que se observou no ensaio de controlo, embora o pH final seja sempre superior, em relação ao pH do ensaio de controlo. Nos ensaios com concentrações de ácido fórmico superiores a 5 g.L^{-1} , observou-se que o pH se mantém relativamente constante ao longo do tempo. O decréscimo mais elevado do pH nos ensaios sem inibidor deve-se ao facto de a levedura produzir metabolitos ácidos enquanto cresce e fermenta. Nos ensaios com ácido fórmico esperava-se que houvesse uma maior acidificação, pois vários autores referem que há uma libertação extra de protões como reacção ao inibidor (Larsson, S. et al, 1999 e Loureiro-Dias et al, 1989). Os ácidos fracos passam através da membrana na sua forma indissociada mas no citosol dissociam-se, acidificando o citoplasma. A célula da levedura vai reagir de modo a compensar esse decréscimo de pH, bombeando protões (H^+) para o exterior através das bombas de protões ATPases, consumindo para isso energia sob a forma de trifosfato de adenosina (ATP). No entanto isso não se verificou, provavelmente porque o ajuste inicial de pH com hidróxido de sódio provocou o aparecimento de efeito tampão no meio que foi tanto mais forte quanto maior a quantidade de hidróxido de sódio adicionada. Por esta razão nos ensaios com concentração mais elevada de ácido fórmico não foi sequer detectada qualquer variação no valor de pH do meio de fermentação.

4.2.2 Consumo de glucose e produção de etanol

Com o objectivo de avaliar a eficiência da fermentação em presença de ácido fórmico, as amostras recolhidas durante o processo foram analisadas segundo o método do reagente DNS (secção 3.6.2), o que permitiu aferir o consumo de glucose pela levedura (figura 4.4).

Como se pode observar, a glucose foi consumida quase na totalidade antes de se atingirem 23 h de processo, para os ensaios com concentrações inferiores a 15 g.L^{-1} de inibidor. No ensaio de 20 g.L^{-1} , a glucose não foi consumida na sua totalidade (apenas $7,6 \text{ g.L}^{-1}$), e a fermentação prolongou-se por mais tempo (tabela 4.4).

Tabela 4.4- Valores de glucose residual e de produção de etanol para ensaios de fermentação com *S. carlsbergensis* em meio MC com 50 g.L⁻¹ de glucos e em presença de ácido fórmico.

Concentração de ácido Fórmico (g.L ⁻¹)	t (h)	glu _{residual} (g.L ⁻¹)	etOH _{máx} (g.L ⁻¹)	Y _{etOH/glu} (g.g ⁻¹)	Y _{etOH/glu} /Y _{(etOH/glu)0}
0	47	0,29	23,5	0,442	1,000
0,5	47	0,33	23,9	0,486	1,104
1	47	0,19	19,2	0,401	0,911
5	47	0,18	18,7	0,380	0,863
10	51	0,18	21,2	0,395	0,897
15	54	0,35	18,4	0,340	0,773
20	143	7,61	15,2	0,382	0,868

Os valores da concentração de etanol produzido ao longo do tempo de fermentação em presença de ácido fórmico foram determinados por cromatografia gás-líquido (secção 3.6.3.) e os resultados obtidos encontram--se na figura 4.5.

Através da análise dos resultados obtidos, verificou-se que o valor da concentração de etanol aumentou com a adição de 0,5 g.L⁻¹ de ácido fórmico, decrescendo nos ensaios com concentrações de ácido fórmico superiores. Contudo, o efeito não foi muito forte pois para concentrações de inibidor até 15 g.L⁻¹ o decréscimo máximo foi 20%. No ensaio com 20 g.L⁻¹ de ácido fórmico, observou-se uma diferença mais acentuada relativamente à concentração máxima de etanol do ensaio sem inibidor (redução de 36%). Verificou-se portanto neste trabalho que a levedura *Saccharomyces carlsbergensis* não se comporta do mesmo modo que a *Saccharomyces cerevisiae* em relação à produção de etanol na presença de ácido fórmico. Segundo Larsson *et al.*, 1999 esta última levedura apresentou aumento na produção de etanol relativamente a ensaios de fermentação de hidrolisados lenhocelulósicos com concentrações inferiores a 4,6 g.L⁻¹ de ácido fórmico e decréscimo para concentrações superiores.

Em relação ao ensaio sem adição de inibidor, os valores de rendimento de etanol em função da glucose não apresentam diferenças acentuadas, pois não excedem 20% de redução o que indica que estas concentrações de inibidor não produzem um efeito bastante visível face à produção de etanol. Este facto deve-se provavelmente à resposta produzida pela célula de levedura face à situação de stresse provocada pela

presença do ácido fórmico, que necessitando de uma fonte de ATP para o funcionamento das ATPases promove a produção de etanol.

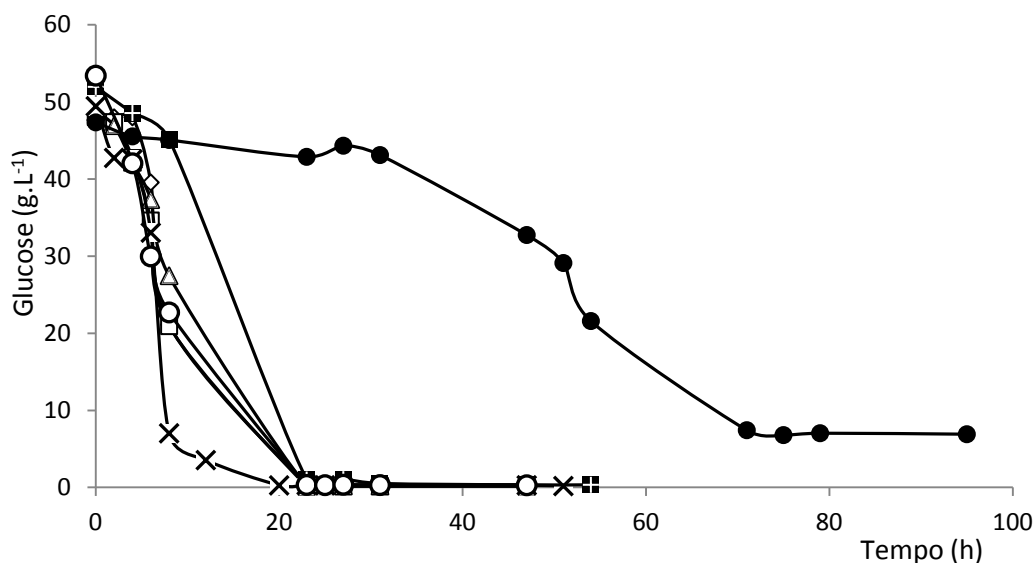


Figura 4.4- Efeito da concentração de inibidor no consumo da fonte de carbono em ensaios de fermentação com *S. carlsbergensis* em meio MC com 50 g.L⁻¹ de glucose e em presença de ácido fórmico (T=50°C; 150 rpm) —○— 0 g.L⁻¹; —●— 0,5 g.L⁻¹; —◇— 0,5 g.L⁻¹; —□— 1 g.L⁻¹; —△— 5 g.L⁻¹; —×— 10 g.L⁻¹; —■— 15 g.L⁻¹; —●— 20 g.L⁻¹. Os valores experimentais da concentração de biomassa são afectados por um erro experimental que não ultrapassa 10% (n=2).

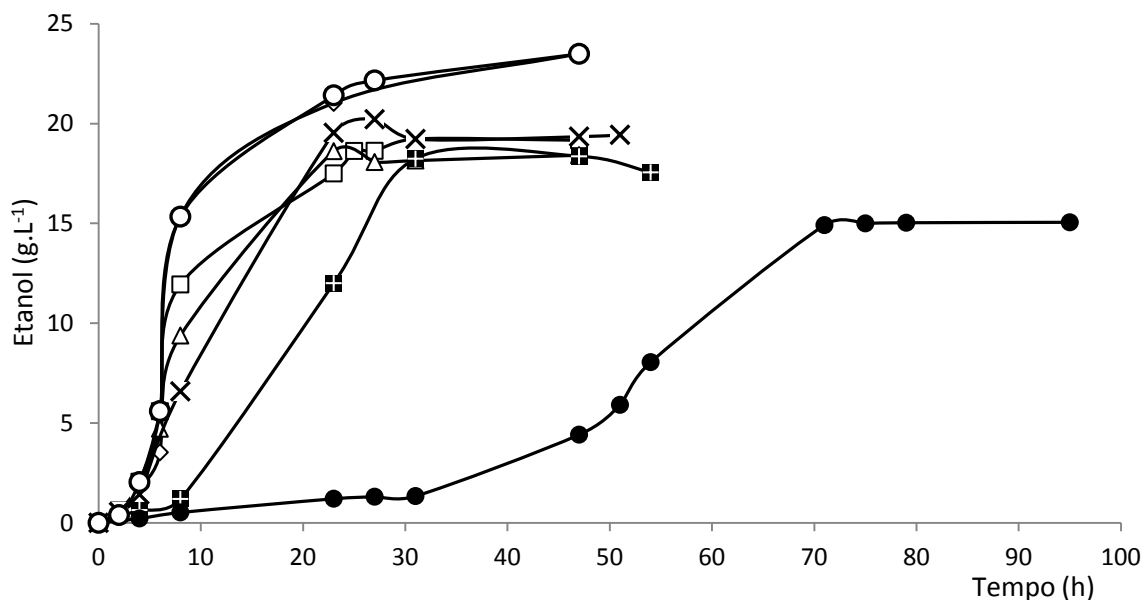


Figura 4.5- Efeito da concentração de inibidor na produção de etanol em ensaios de fermentação com *S. carlsbergensis* em meio MC com 50 g.L⁻¹ de glucose e em presença de ácido fórmico (T=50°C; 150 rpm): —○— 0g.L⁻¹; —◇— 0,5 g.L⁻¹; —□— 1 g.L⁻¹; —△— 5 g.L⁻¹; —×— 10 g.L⁻¹; —■— 15 g.L⁻¹; —●— 20 g.L⁻¹. Os valores experimentais da concentração de biomassa são afectados por um erro experimental que não ultrapassa 10% (n=2).

4.3 Concentração de ácido fórmico

A partir das análises efectuadas por HPLC (secção 3.6.4.), foi possível observar que os valores da concentração de ácido fórmico se mantiveram em geral constantes ao longo do tempo (figura 4.6).

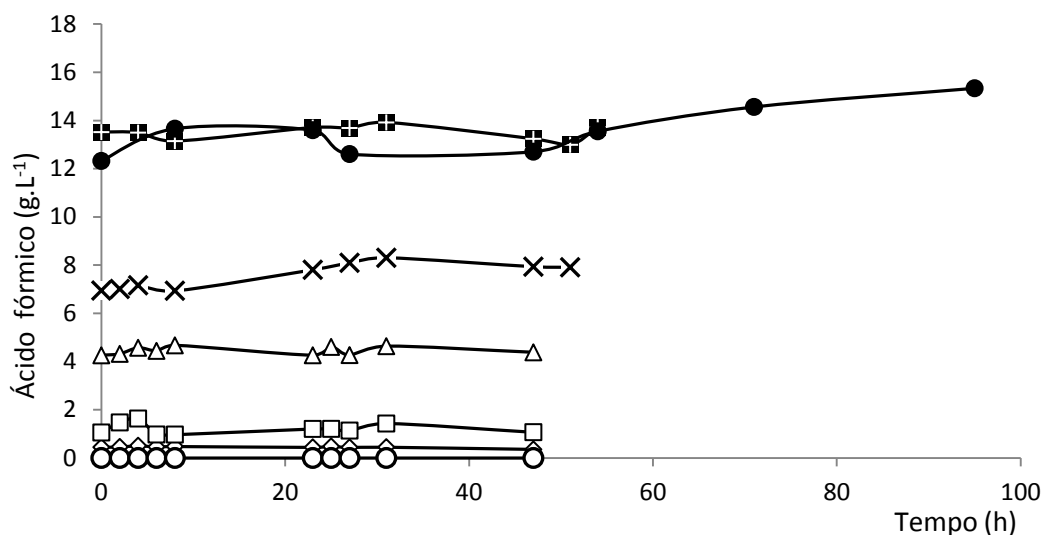


Figura 4.6 - Variação da concentração de inibidor em ensaios de fermentação com *S. carlsbergensis* em meio MC com 50g.L⁻¹ de glucose e ácido fórmico (T=50°C; 150 rpm): ○ 0g.L⁻¹; ◇ 0,5 g.L⁻¹; □ 1 g.L⁻¹; △ 5 g.L⁻¹; × 10 g.L⁻¹; ■ 15 g.L⁻¹; ● 20 g.L⁻¹.

No ensaio de controlo não foi identificada presença de ácido fórmico, como seria de esperar, não sendo este composto produzido durante a fermentação alcoólica. Relativamente aos ensaios com adição de inibidor, pode verificar-se que não houve consumo de ácido fórmico.

4.4 Citometria de fluxo multiparamétrica

4.4.1 Optimização de métodos e protocolos de utilização de corantes

→ Estado da membrana

De modo a avaliar o efeito de coloração proporcionada por diferentes corantes em resposta à análise do estado das membranas (citoplasmática e mitocondrial) de *Saccharomyces carlsbergensis*, foram efectuados ensaios com adição dos corantes a

células em estados fisiológicos diferentes recolhidas durante um ensaio de fermentação (com menos de 24h – em fase de crescimento exponencial, e com mais de 96h - em fase de morte celular) (secção 3.5.).

Para avaliar a quebra de potencial de membrana, testou-se um corante fluorescente da família das carbocianinas, o DiOC₆(3), catiónico, que responde a alterações dos gradientes electroquímicos das membranas citoplasmática e mitocondrial por alteração da fluorescência que emite. A eficiência do método foi testada em células de *S. carlsbergensis* incubadas com o ionóforo m-clorofenilhidrazona cianida carbonil (CCCP) (colapsador do potencial de membrana).

A integridade da membrana foi também analisada utilizando o corante PI que, sendo incapaz de atravessar uma membrana intacta, se acumula nas células danificadas ou mortas, agregando-se ao DNA e emitindo fluorescência (Silva *et al.*, 2005b, Attfield *et al.*, 2008).

Na figura 4.7, podemos observar células de *S. carlsbergensis* submetidas à simulação de quebra de potencial de membrana e coradas com DiOC₆(3) e PI.

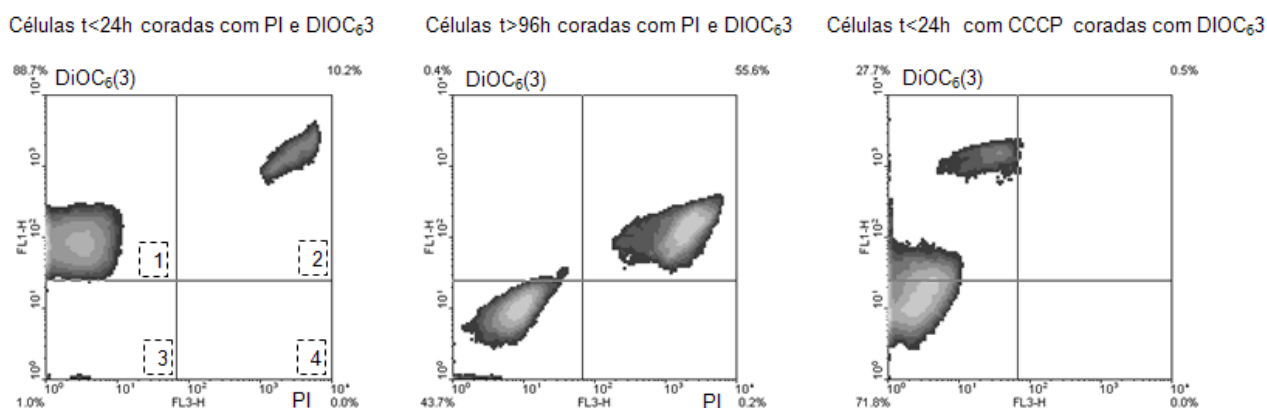


Figura 4.7- Citogramas relativos a ensaios com diferentes corantes aplicados a células de *S. carlsbergensis* provenientes de um ensaio de fermentação, recolhidas com menos de 24h e mais de 96h (1 – células polarizadas com membrana íntegra; 2 – células em avançado estado de lise; 3 – células intactas com membrana despolarizada; 4 – células despolarizadas com membrana permeabilizada).

Os resultados obtidos com a mistura de PI e DiOC₆(3), indicaram uma percentagem de células com membrana íntegra de cerca de 88% (quadrante 1), para células com menos de 24h (em fase exponencial), apresentando também uma população representativa de células com membrana em avançado estado de lise (quadrante 2). Verificou-se que a percentagem de células com membrana em avançado estado de lise (quadrante 2) aumentou acentuadamente no ensaio realizado com células com mais de 96h (em fase de morte). No citograma que se refere à análise de células com mais de 96h, com indução de quebra de potencial de membrana com CCCP, pode observar-se que se obteve uma maior percentagem de células com membrana despolarizada (quadrante 3) relativamente ao ensaio realizado para células nas mesmas condições, sem adição de CCCP.

Conclui-se que foram obtidas respostas coerentes a partir da utilização dos corantes PI e DiOC₆(3) em simultâneo, com emissão de radiação em FL1 e FL3 (secção 3.5), obtendo-se os valores relativos a percentagens de células com membrana íntegra, com membrana despolarizada, e células em avançado estado de lise celular.

Na figura 4.8, podemos observar células de *S. carlsbergensis*, coradas com DiOC₆(3) após um período de tempo de incubação de 10 min. Foi possível observar que o corante DiOC₆(3) penetrou nas células, atravessando a membrana citoplasmática e ligou-se às mitocôndrias, cuja membrana se encontrava despolarizada.

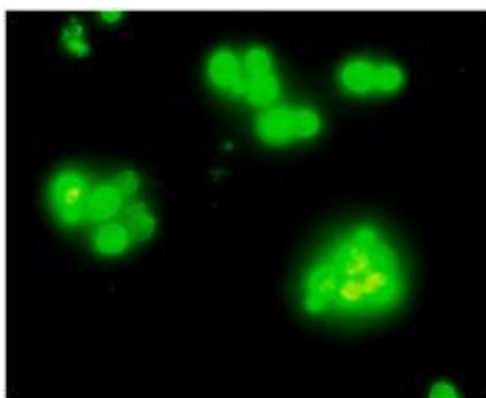


Figura 4.8- Células de *S. carlsbergensis* coradas com DiOC₆(3) após incubação com CCCP (ampliação 1000x em contraste de fase).

→ Espécies reactivas de oxigénio

De modo a avaliar a resposta das células de *S. carlsbergensis* ao corante 123-DHR, para detecção da presença de espécies reactivas de oxigénio no interior das células, foram efectuadas análises de suspensões celulares de células com menos de 24h (em fase exponencial), células com mais de 96 h (fase de morte por carência de fonte carbono) e células nas mesmas condições incubadas previamente com etanol 70% (v.v⁻¹), durante 40 min, seguindo o protocolo sugerido por Landolfo *et al.*, 2008. A adição de etanol permitiria a avaliação do estado das células relativamente à formação de ROS em condições de stresse provocado pela toxicidade do etanol presente no meio. Este efeito de toxicidade foi já reconhecido relativamente à formação de ROS em ensaios com *S. cerevisiae* (Landolfo *et al.*, 2008). A figura 4.9 ilustra os resultados relativamente à presença de espécies reactivas de oxigénio.

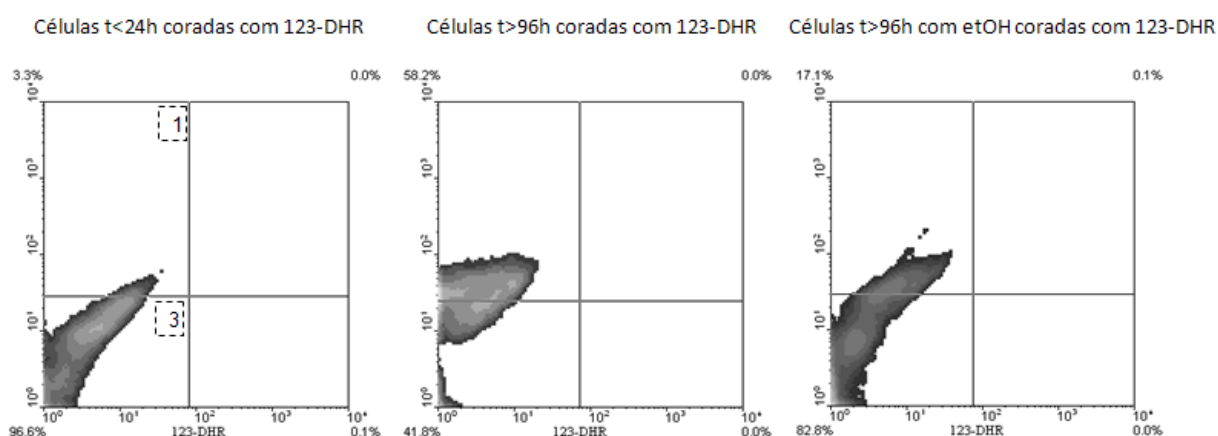
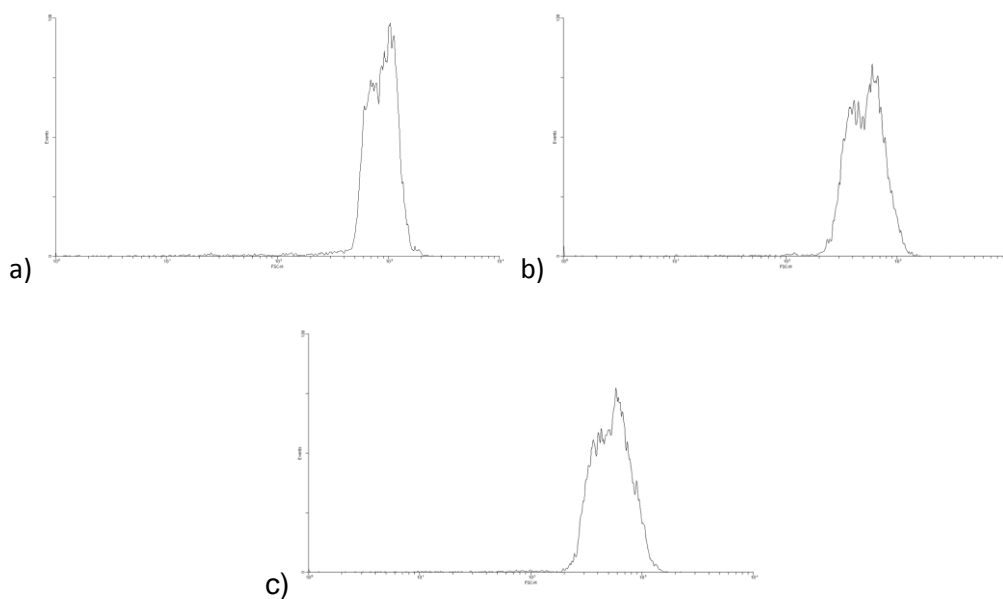


Figura 4.9- Citogramas relativos a ensaios com 123-DHR aplicados a células de *S. carlsbergensis* colhidas durante ensaios de fermentação com menos de 24 h e mais de 96 h e células incubadas em etanol (1 – células com ROS; 3 – células normais).

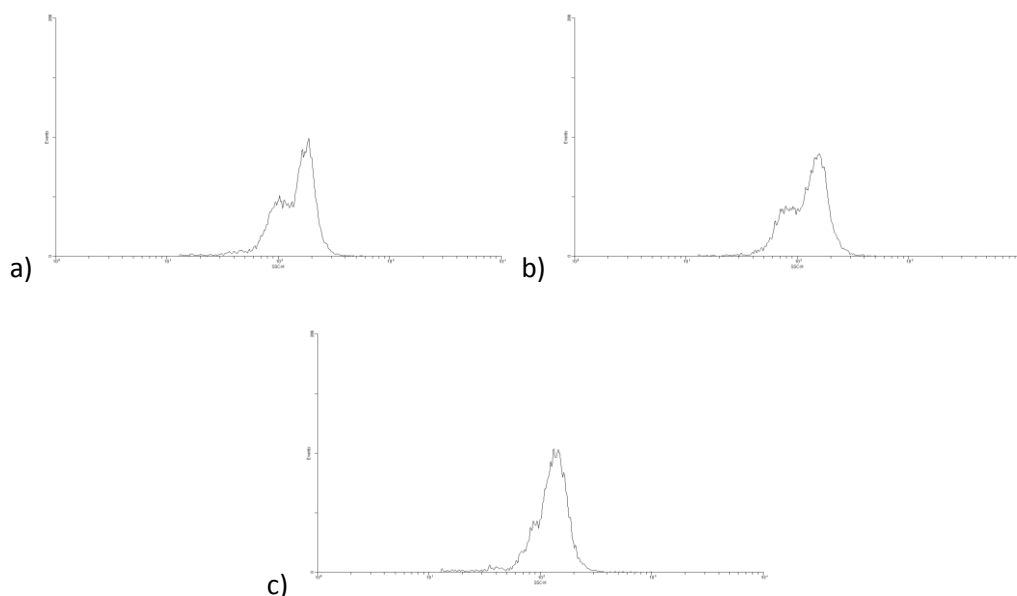
Verificou-se que as amostras de células incubadas previamente em etanol apresentaram menores percentagens de células com formação de ROS do que as células não incubadas. Isto significa que apesar de as células pré-tratadas com etanol serem consideradas como um controlo positivo de oxidação, (Landolfo *et al.*, 2008), a carência de glucose induziu à formação de ROS, em maior percentagem de células. A razão para o que se observou poderá residir no facto de o tempo de incubação com etanol (10 min) não ter sido suficiente para que se detectasse indução da produção de ROS, embora tenha sido suficiente para promover a permeabilização da membrana.

4.4.2 Tamanho e complexidade das células de *S. carlsbergensis*

O tamanho e a complexidade das células de *S. carlsbergensis* foram analisados através do detector de dispersão frontal (FS), responsável pela análise do tamanho e do detector lateral (SS), responsável pela análise da complexidade. Não foi possível identificar uma evolução ao longo dos ensaios com crescentes concentrações de ácido fórmico, apresentando-se nas figuras 4.1 e 4.2 os histogramas relativos ao ensaio com $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido fórmico.



4.10- Histogramas referentes à evolução do tamanho (FS) das células de *S. carlsbergensis* com $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido fórmico: a) fase de latência; b) fase exponencial; c) fase estacionária.



4.11- Histogramas referentes à evolução da complexidade (SS) das células de *S. carlsbergensis* com $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido fórmico: a) fase de latência; b) fase exponencial; c) fase estacionária.

4.4.3 Integridade da membrana citoplasmática e potencial da membrana mitocondrial

As análises por citometria para avaliação das alterações fisiológicas ocorridas nas células de *S. carlsbergensis* em ensaios de fermentação com adição de ácido fórmico, foram realizadas em células recolhidas durante as diferentes fases do processo: latência, exponencial, estacionária e de morte.

→Fase de latência

O citograma apresentado na figura 4.10, refere-se ao ensaio sem inibidor realizado com o objectivo de caracterizar o estado das membranas de células com 4h de fermentação. A mancha mais densa foi identificada no quadrante 1, referindo-se a células com membrana íntegra. Nesta fase, provavelmente devido à adaptação ao meio, foi identificada uma mancha no quadrante 3 que representa uma população de células com membrana despolarizada. No quadrante 2 foi identificada uma pequena população de células em avançado estado de lise celular..

Nos citogramas da figura 4.11 é possível observar-se que para fermentações em presença de concentrações baixas de ácido fórmico ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$ e 1 g.L^{-1}), a percentagem de células saudáveis (mancha no quadrante 1) na fase de latência é superior à percentagem de células com membrana danificada (mancha no quadrante 3). Este facto altera-se para concentrações de inibidor superiores a 5 g.L^{-1} , diminuindo a percentagem de células com membrana intacta e aumentando a percentagem de células com membrana despolarizada.

Na figura 4.12 podem observar-se as células de *S. carlsbergensis* na fase de latência (2h-4h) observadas ao microscópio, verificando-se baixa densidade celular ao longo de todos os ensaios.

Nesta fase de crescimento, verificou-se que as percentagens de células com membrana íntegra não variam muito nos ensaios de concentrações de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ e 1 g.L^{-1} de ácido fórmico, em relação ao ensaio sem inibidor, mantendo-se acima dos 75%, tal como se pode constatar nas figuras 4.11 e 4.13. No ensaio com 5 g.L^{-1} de ácido fórmico a percentagem de células com membrana íntegra decresceu bastante, até aos 32%, continuando a decrescer com o aumento da concentração de inibidor.

A população de células com membrana despolarizada atingiu percentagens de 20% e 16% nos ensaios com $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ e 1 g.L^{-1} de inibidor, respectivamente, não variando

acentuadamente em relação ao ensaio sem inibidor (18%). Verificou-se, no entanto, um aumento da percentagem de células despolarizadas no ensaio em presença de 5 g.L⁻¹ de ácido fórmico atingindo 55%. Para concentrações superiores continuou a observar-se aumento com o acréscimo de concentração de inibidor, atingindo valores na ordem dos 90%. Pela análise dos resultados obtidos relativamente a esta fase, pode verificar-se que o ácido fórmico tem um efeito bastante visível na quebra de potencial de membrana.

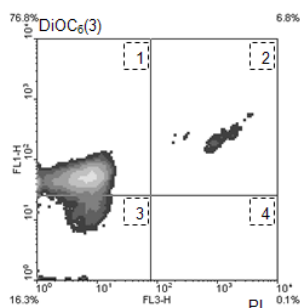


Figura 4.12 - Citograma referente ao estado da membrana de células de *S. carlsbergensis* recolhidas na fase de latência de um ensaio de fermentação sem adição de inibidor e coradas com PI e DiOC₆(3) (1 – células polarizadas com membrana íntegra; 2 – células em avançado estado de lise; 3 – células intactas com membrana despolarizada; 4 – células despolarizadas com membrana permeabilizada).

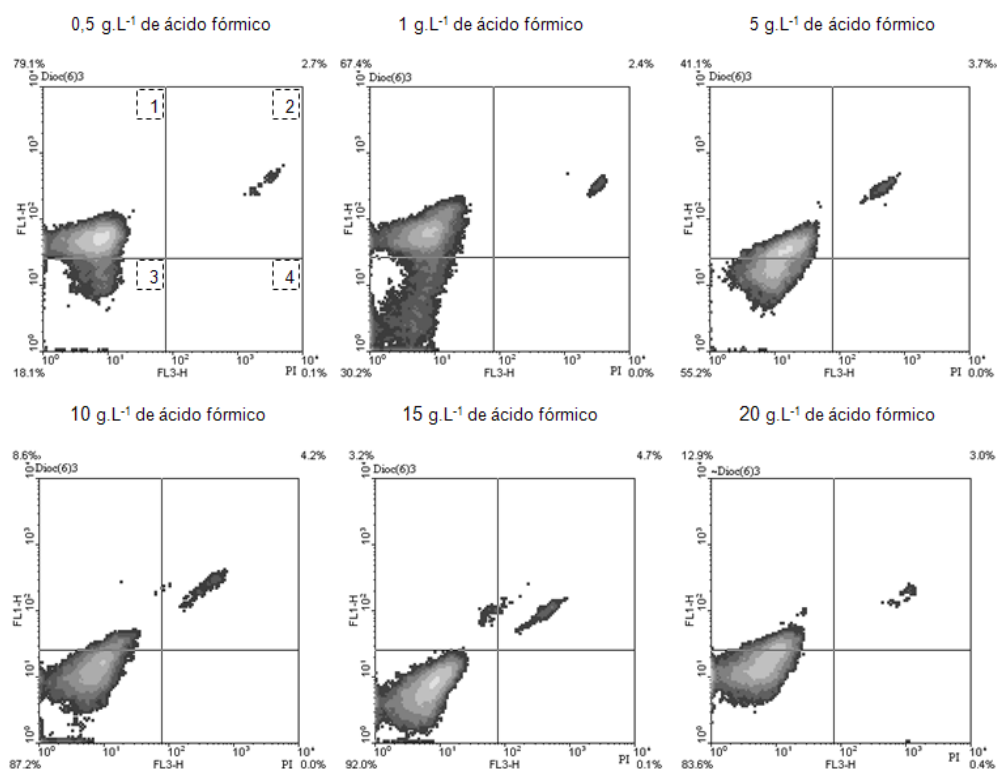


Figura 4.13- Citogramas referentes ao estado da membrana de células de *S. carlsbergensis* recolhidas na fase de latência de ensaios de fermentação com adição de ácido fórmico e coradas com PI e DiOC₆(3) (1 – células polarizadas com membrana íntegra; 2 – células em avançado estado de lise; 3 – células intactas com membrana despolarizada; 4 – células despolarizadas com membrana permeabilizada).

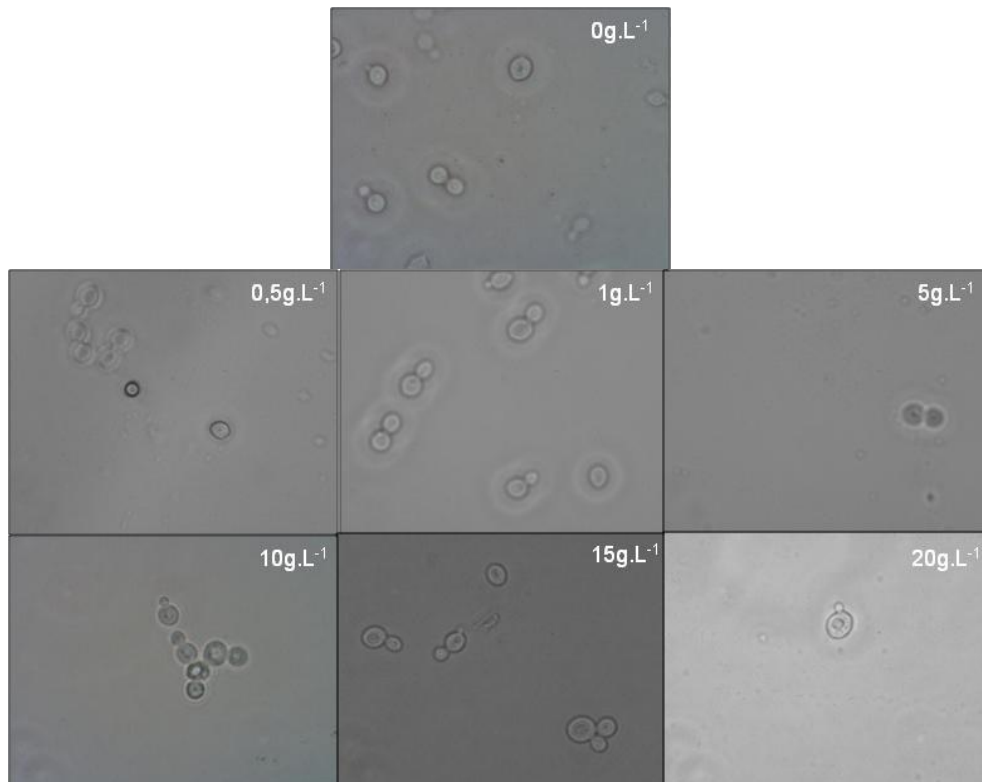


Figura 4.14- Células de *S. carlsbergensis* recolhidas na fase de latência ($t=2\text{h}-4\text{h}$) de ensaios de fermentação com concentrações crescentes de ácido fórmico (ampliação de 1000x).

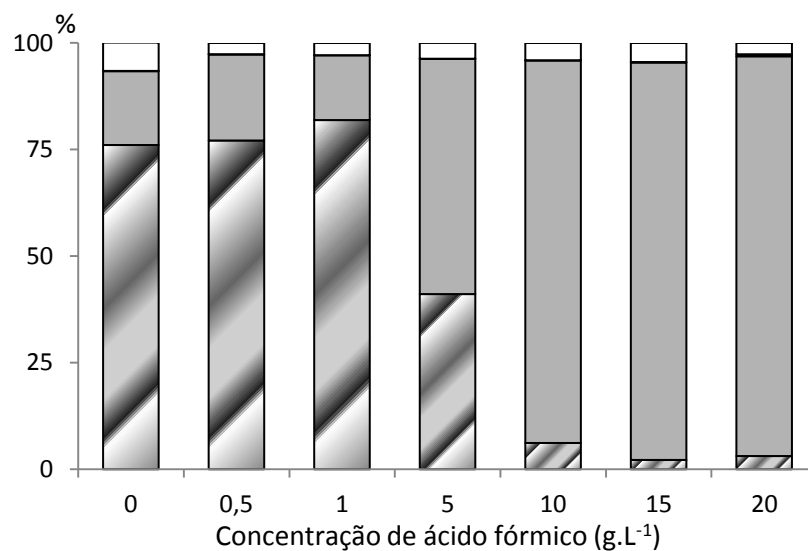


Figura 4.15- Estado da membrana citoplasmática de células de *S. carlsbergensis* recolhidas na fase de latência de ensaios de fermentação em presença de ácido fórmico: □ Células em estado avançado de lise; ■ Células despolarizadas com membrana permeabilizada; ■ Células intactas com membrana despolarizada; ■ Células polarizadas com membrana íntegra.

As populações de células em estado avançado de lise celular não apresentaram variações acentuadas em relação ao aumento de concentração de inibidor, verificando-se o mesmo em relação à percentagem de células mortas com membrana despolarizada, com percentagens abaixo de 1% em todos os ensaios.

→Fase exponencial

Relativamente aos resultados obtidos com células recolhidas na fase de latência, na fase exponencial e para as células do ensaio sem inibidor, verificou-se que a subpopulação 1 diminuiu ligeiramente, aumentando a densidade da subpopulação 3 (figuras 4.10 e 4.14). Verificou-se que nesta fase as variações são ainda pouco acentuadas.

Nos ensaios com adição de inibidor, usando células da fase exponencial e em relação à fase anterior, de uma forma geral, verificou-se, um aumento da percentagem de células com membrana despolarizada (quadrante 3), diminuindo a percentagem de células com membrana íntegra (quadrante 1), o que indica que, nesta fase, as células de *S. carlsbergensis* estão a responder mais fortemente à situação de stresse provocada pela crescente concentração de ácido fórmico no meio, tal como se pode observar na figura 4.15.

Também se pode observar na figura 4.16 que as células da levedura em fase exponencial de crescimento começam já a indiciar alguns sinais de stresse, sendo visíveis ao microscópio vários aglomerados e algumas células deformadas.

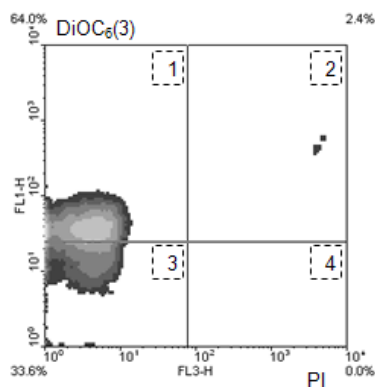


Figura 4.16- Citograma referente ao estado da membrana de células de *S. carlsbergensis* recolhidas na fase exponencial do ensaio de fermentação sem inibidor e coradas com PI e DiOC₆(3) (1 – células polarizadas com membrana íntegra; 2 – células em avançado estado de

lise; 3 – células intactas com membrana despolarizada; 4 – células despolarizadas com membrana permabilizada).

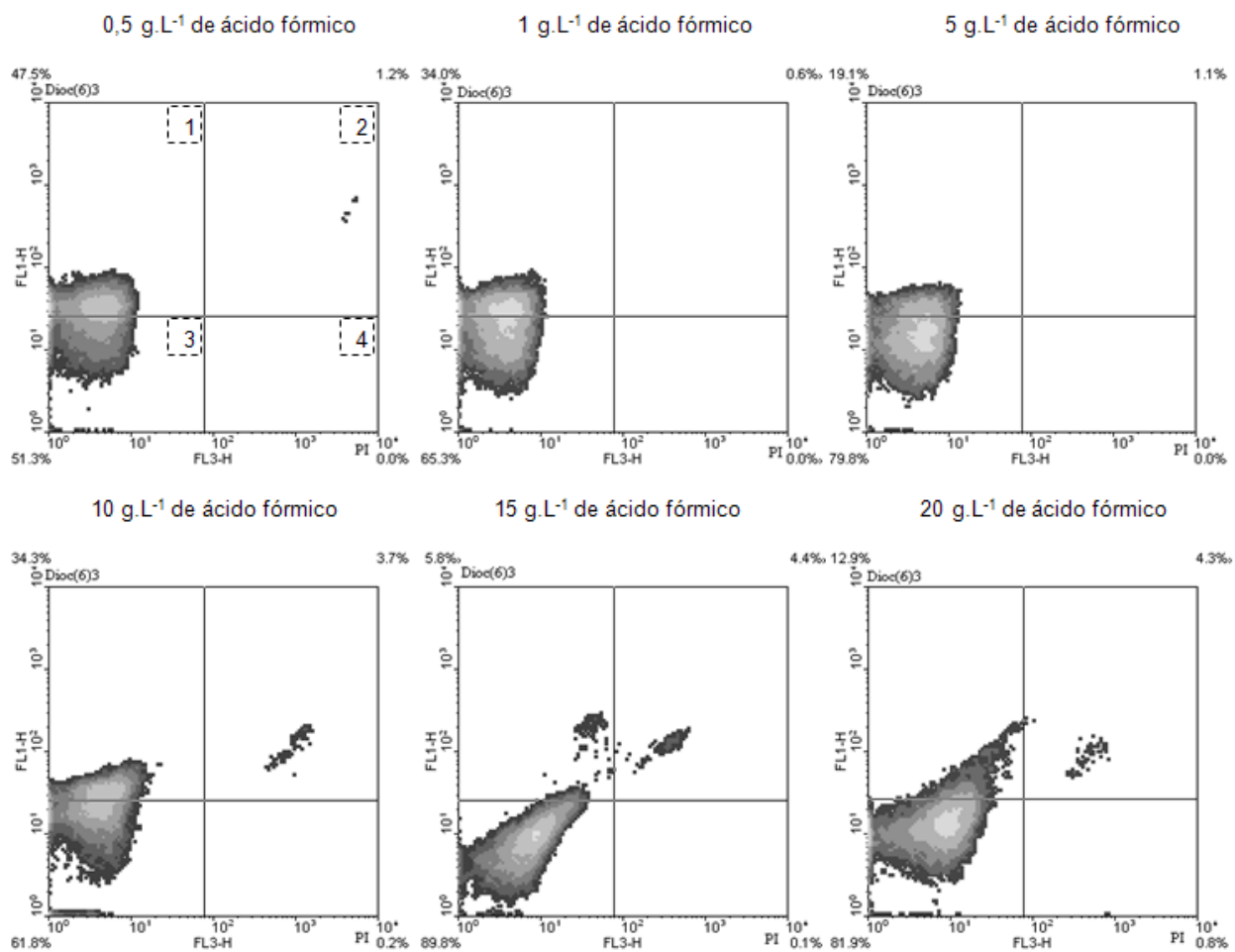


Figura 4.17- Citogramas referentes ao estado da membrana de células de *S. carlsbergensis* recolhidas na fase exponencial de ensaios de fermentação com adição de ácido fórmico e coradas com PI e DiOC₆(3) (1 – células polarizadas com membrana íntegra; 2 – células em avançado estado de lise; 3 – células intactas com membrana despolarizada; 4 – células despolarizadas com membrana permabilizada).

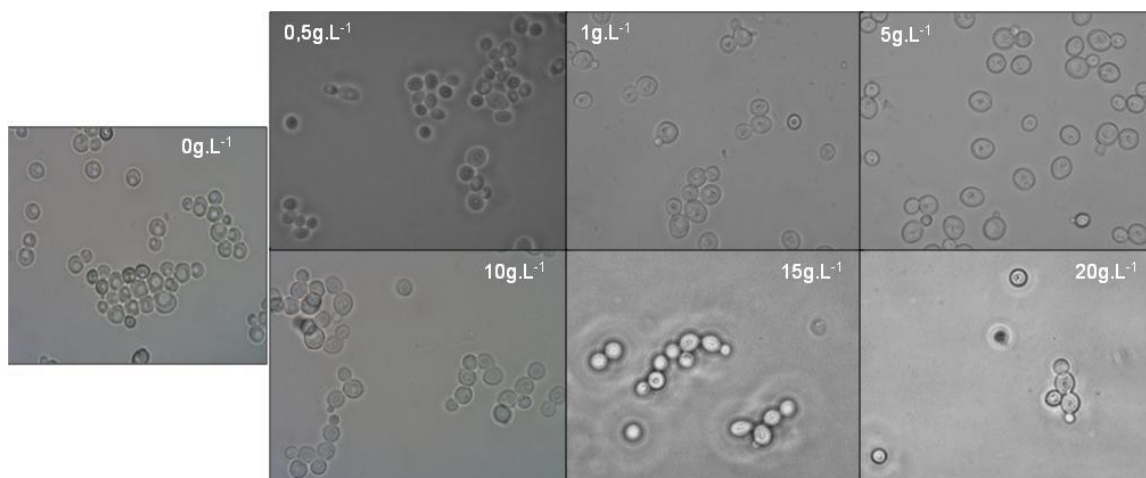


Figura 4.18- Células de *S. carlsbergensis* recolhidas na fase exponencial (8h-72h) de ensaios de fermentação com concentrações crescentes de ácido fórmico (ampliação de 1000x).

Na fase exponencial da fermentação a proporção da subpopulação 1 (células com membrana íntegra) diminuiu com o aumento de concentração de inibidor, afastando-se bastante dos valores do ensaio sem inibidor, como se pode observar na figura 4.17. A percentagem de células com membrana despolarizada vai aumentando, passando de 57% (no ensaio com 0,5 g.L⁻¹), para 86% (no ensaio de 5 g.L⁻¹).

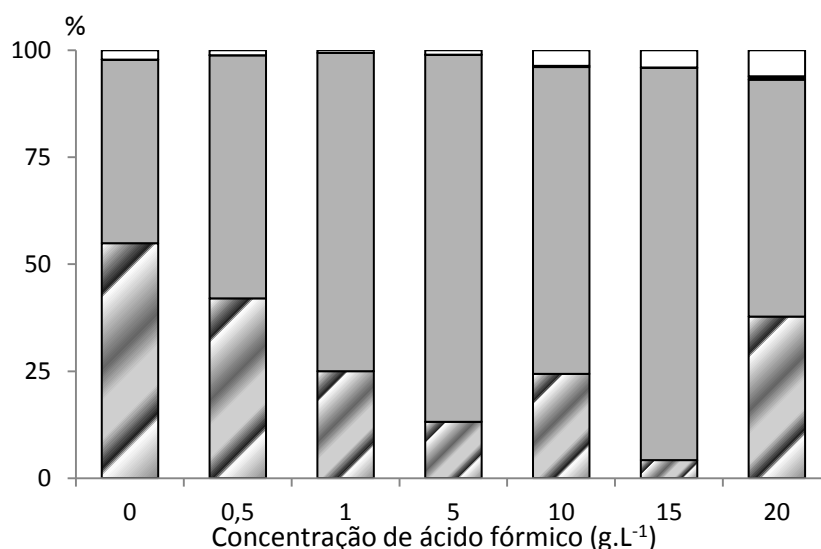


Figura 4.19- Estado da membrana citoplasmática de células de *S. carlsbergensis* recolhidas na fase exponencial de ensaios de fermentação em presença de ácido fórmico: □ Células em estado avançado de lise; ■ Células despolarizadas com membrana permeabilizada; ■ Células intactas com membrana despolarizada; ▨ Células polarizadas com membrana íntegra.

Para as concentrações de 10 g.L⁻¹ e 20 g.L⁻¹ de ácido fórmico, a percentagem de células despolarizadas parece diminuir, aumentando ligeiramente a percentagem de células íntegras polarizadas. Isto poderá dever-se ao facto da produção de etanol nesta fase ser menor na presença de concentrações mais elevadas de inibidor. Para além disso, acima da concentração de 10 g.L⁻¹ de inibidor, o crescimento da levedura diminuiu, tendo a taxa específica de crescimento reduzido cerca de 50% (tabela 4.2), consequentemente a produção de metabolitos ácidos diminuiu também. De notar também que nos ensaios com concentrações mais elevadas de inibidor, a percentagem de células em avançado estado de lise celular aumenta.

→Fase estacionária

Em relação aos resultados obtidos com células recolhidas na fases de latência e exponencial, verificou-se, ao analisar células recolhidas na fase estacionária, um aumento substancial da percentagem de células despolarizadas, de uma forma geral, tal como se pode verificar a partir da análise dos citogramas das figuras 4.18 e 4.19.

Notou-se um aumento da população no quadrante 3, e também no quadrante 2, onde as manchas se intensificaram, o que indica que a percentagem de células em estado avançado de lise aumentou.

Nesta fase seria de esperar algumas destas observações pois as células encontram-se em stresse provocado pela privação de fonte de carbono (figura 4.4) e pela quantidade de etanol no meio para além da concentração de ácido fórmico.

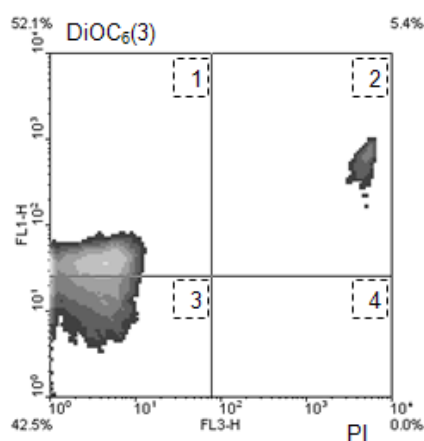


Figura 4.20 - Citograma referente ao estado da membrana de células de *S. carlsbergensis* recolhidas na fase estacionária do ensaio de fermentação sem inibidor e coradas com PI e DiOC₆(3) no ensaio de controlo (1 – células polarizadas com membrana íntegra; 2 – células em avançado estado de lise; 3 – células intactas com membrana despolarizada; 4 – células despolarizadas com membrana permabilizada).

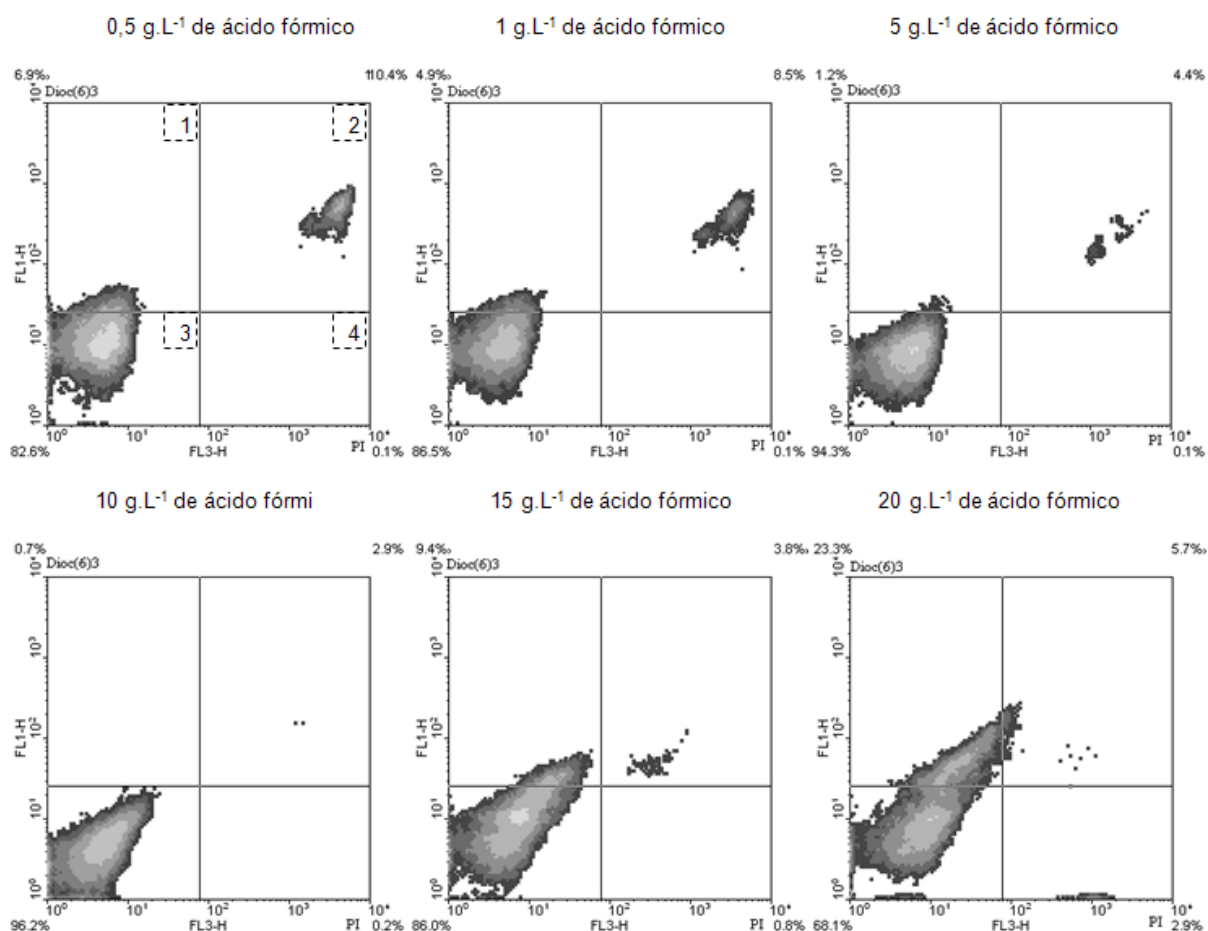


Figura 4.21- Citogramas referentes ao estado da membrana citoplasmática de células de *S. carlsbergensis* recolhidas na fase estacionária de ensaios de fermentação com adição de ácido fórmico e coradas com PI e DiOC₆(3) (1 – células polarizadas com membrana íntegra; 2 – células em avançado estado de lise; 3 – células intactas com membrana despolarizada; 4 – células despolarizadas com membrana permeabilizada).

Relativamente ao ensaio sem inibidor, verificou-se nesta fase uma diminuição bastante acentuada da percentagem de células, colhidas nos ensaios com ácido fórmico, com membrana íntegra, como seria de esperar e tal como se pode observar no gráfico da figura 4.20. A percentagem maior de células com membrana íntegra (18%) registou-se no ensaio com 20 g.L⁻¹ de ácido fórmico, embora neste ensaio tenham sido também registados os valores mais elevados de percentagem de células mortas e com membrana despolarizada (cerca de 2%). O facto de ter sido registada maior percentagem de células com membrana íntegra, no ensaio com 20 g.L⁻¹ de inibidor coincide com os menores valores de produção máxima de etanol, o que significa que nesta fase as células poderão ter sofrido menos efeito tóxico do etanol. Para além disso, neste ensaio a fonte de carbono não se esgotou, pelo que as células não ficaram sujeitas ao stress provocado pela carência.

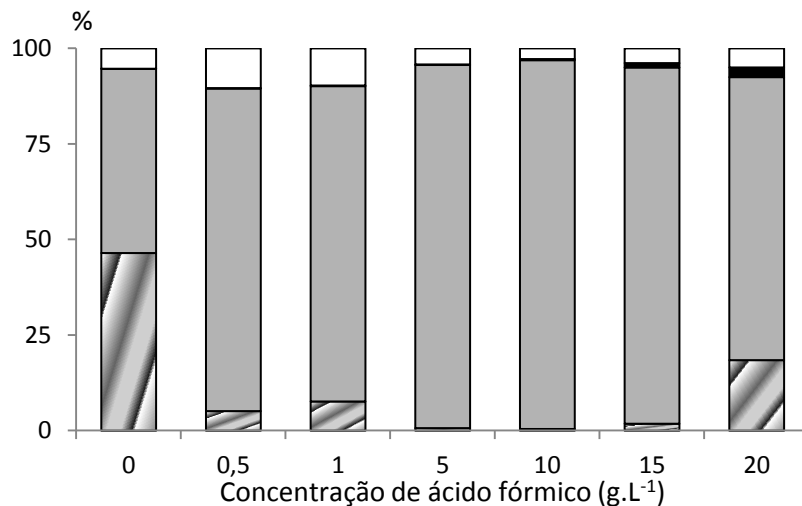


Figura 4.22- Estado da membrana citoplasmática de células de *S. carlsbergensis* recolhidas na fase estacionária de ensaios de fermentação em presença de ácido fórmico: □ Células em estado avançado de lise; ■ Células despolarizadas com membrana permeabilizada; ▒ Células intactas com membrana despolarizada; ▨ Células polarizadas com membrana íntegra.

→Fase de morte celular

Comparativamente com os dados obtidos com células colhidas na fase estacionária, o ensaio sem inibidor, revelou um aumento acentuado da mancha do quadrante 2, referente à percentagem de células em estado avançado de lise, o que corresponde ao esperado para esta fase. Consequentemente, a população que representa as células íntegras (quadrante 1) diminuiu substancialmente, tal como se pode observar na figura 4.21.

Na fase de morte celular a população de células com membrana despolarizada aumenta, notando-se a descida da mancha do quadrante 1 para o quadrante 3, à medida que aumenta a concentração de inibidor. A mancha que representa a população de células em avançado estado de lise celular (quadrante 2) é maior nos ensaios com concentrações mais baixas de ácido fórmico, tal como se pode observar na figura 4.22. Nesta fase o stresse principal poderá resultar da privação de fonte de carbono já que, nesta fase, a glucose já tinha sido consumida na sua totalidade (figura 4.4).

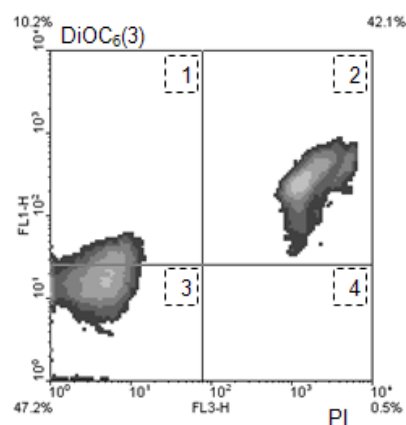


Figura 4.23- Citograma referente ao estado da membrana de células de *S. carlsbergensis* recolhidas na fase de morte do ensaio de fermentação sem inibidor e coradas com PI e DiOC₆(3) (1 – células polarizadas com membrana íntegra; 2 – células em avançado estado de lise; 3 – células intactas com membrana despolarizada; 4 – células despolarizadas com membrana permeabilizada).

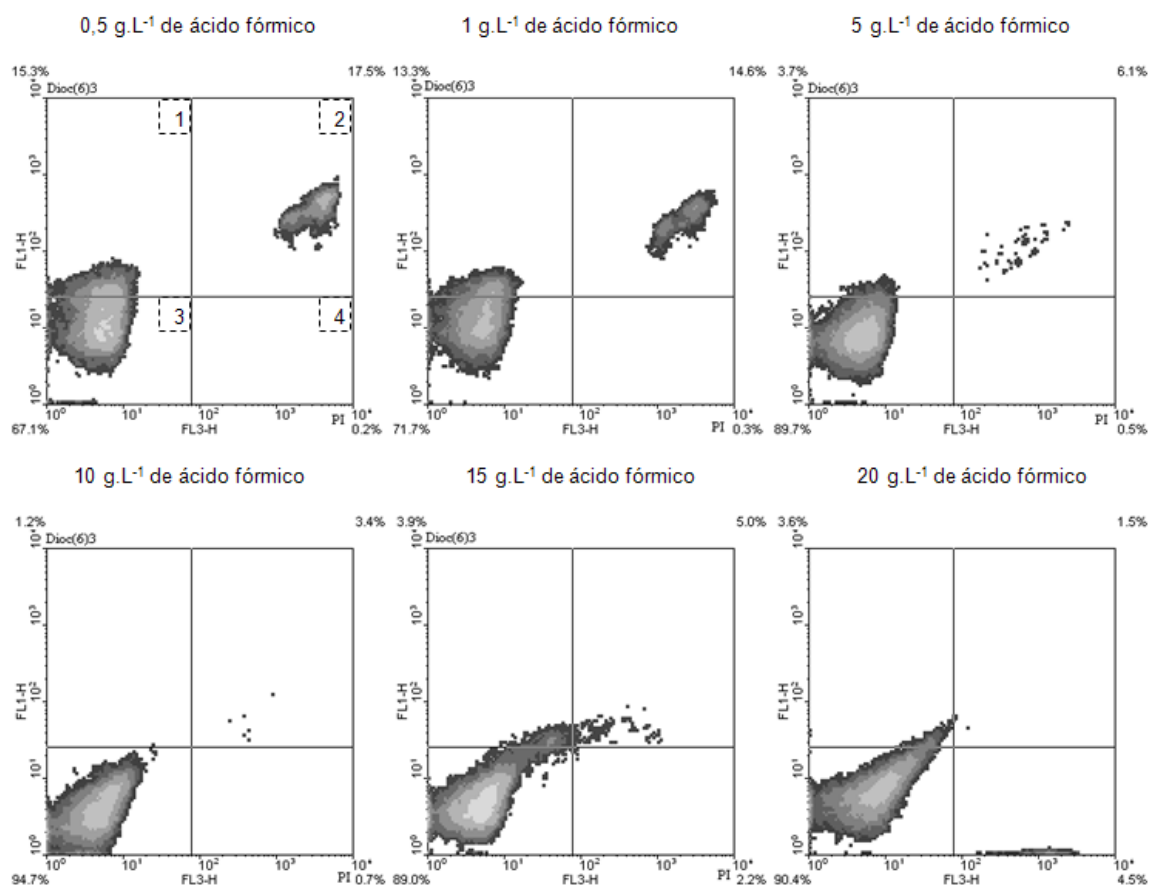


Figura 4.24- Citogramas referentes ao estado da membrana citoplasmática de células de *S. carlsbergensis* recolhidas na fase de morte de ensaios de fermentação em presença de ácido fórmico e coradas com PI e DiOC₆(3) (1 – células polarizadas com membrana íntegra; 2 – células em avançado estado de lise; 3 – células intactas com membrana despolarizada; 4 – células despolarizadas com membrana permeabilizada).

Na figura 4.23 podem observar-se células de *S. carlsbergensis* entre a fase estacionária e a fase de morte celular, verificando-se a presença de aglomerados mais densos que os observados na fase estacionária.

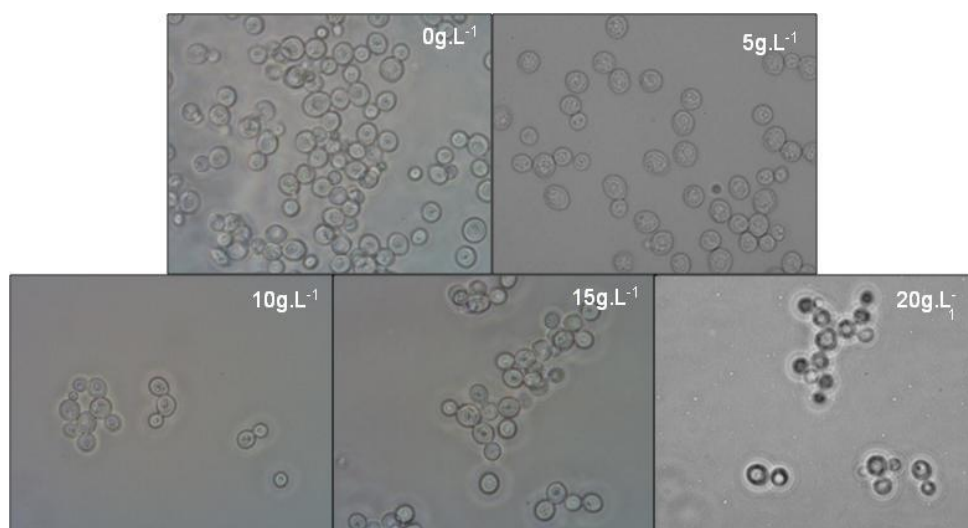


Figura 4.25 - Células de *S. carlsbergensis* recolhidas na fase de morte celular ($t > 48h$) de ensaios de fermentação nos ensaios com concentrações crescentes de ácido fórmico (ampliação 1000x)

As maiores percentagens de células despolarizadas registaram-se nesta fase, sendo as percentagens de células com membrana íntegra bastante mais baixas relativamente às fases anteriores. Nos ensaios com concentração de inibidor de 15 g.L⁻¹ e 20 g.L⁻¹, verificou-se um aumento da percentagem de células mortas e com membrana despolarizada, atingindo os 18% no ensaio com 20 g.L⁻¹ de inibidor, como se observa no gráfico da figura 4.24.

Tanto na fase estacionária como na fase de morte celular, verificou-se um aumento bastante acentuado da percentagem de células com membrana despolarizada. O efeito inibidor de ácidos fracos como o fórmico, foi já reconhecido pelo facto de a forma indissociada do ácido, sendo lipofílica, ter a capacidade de atravessar a membrana citoplasmática através de difusão. No caso particular do ácido fórmico, essa passagem é facilitada pelo facto de a molécula ter um tamanho pequeno. No citosol, ocorre a dissociação do ácido que resultará na libertação de protões (H⁺) e do anião do ácido, comprometendo a integridade da membrana (Mira *et al.*, 2010). O aumento da concentração de protões no citosol vai contribuir para a perda de potencial de membrana, alterando o gradiente electroquímico que tende a reagir no sentido de

compensar esse aumento, despolarizando a membrana. Deste modo, a célula fica vulnerável à invasão de iões e outros metabolitos que poderão inibir o seu metabolismo (Mira *et al.*, 2010).

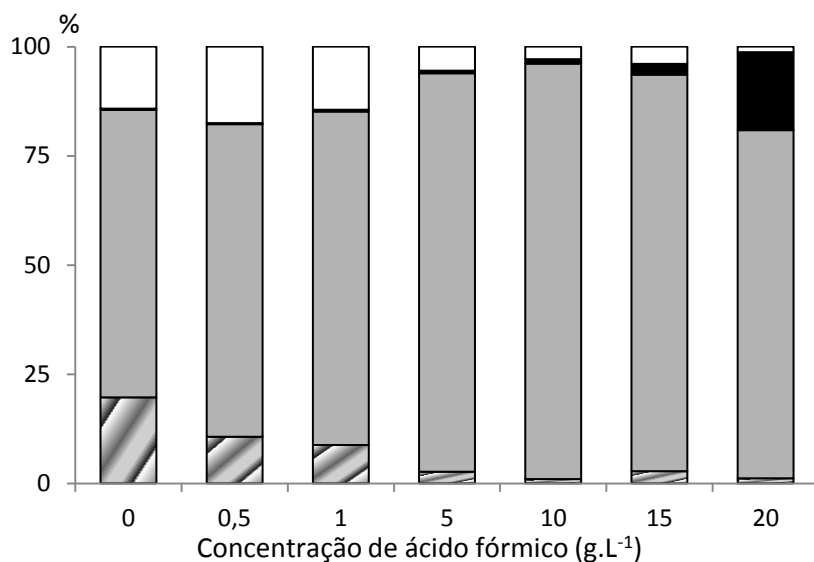


Figura 4.26- Estado da membrana citoplasmática de células de *S. carlsbergensis* recolhidas na fase de morte celular de ensaios de fermentação em presença de ácido fórmico: □ Células em estado avançado de lise; ■ Células despolarizadas com membrana permeabilizada; ▒ Células intactas com membrana despolarizada; ▤ Células polarizadas com membrana íntegra.

4.4.4 Formação de espécies reactivas de oxigénio

→Fase de latência

Na fase de latência, a percentagem de células com espécies reactivas de oxigénio é, de um modo geral, baixa. Os valores mais elevados registaram-se no ensaio com 5 g.L⁻¹, com 36%, tal como se pode observar no gráfico da figura 4.25. Trata-se de uma fase de adaptação das células ao meio pelo que não foi possível estabelecer uma relação entre a percentagem de células com ROS e o aumento de concentração de ácido fórmico.

Na figura 4.26 pode observar-se o citograma referente a células do ensaio sem inibidor recolhidas na fase de latência, verificando-se que, nesta fase, a mancha predominante

se encontra no quadrante 3, que representa a população de células normais sem ROS.

Os citogramas da figura 4.27 demonstram que a população de células normais (sem ROS) (quadrante 3) vai decrescendo com o aumento da concentração de inibidor, notando-se a subida da mancha representativa da população, para o quadrante 1, onde se regista a percentagem de células com ROS.

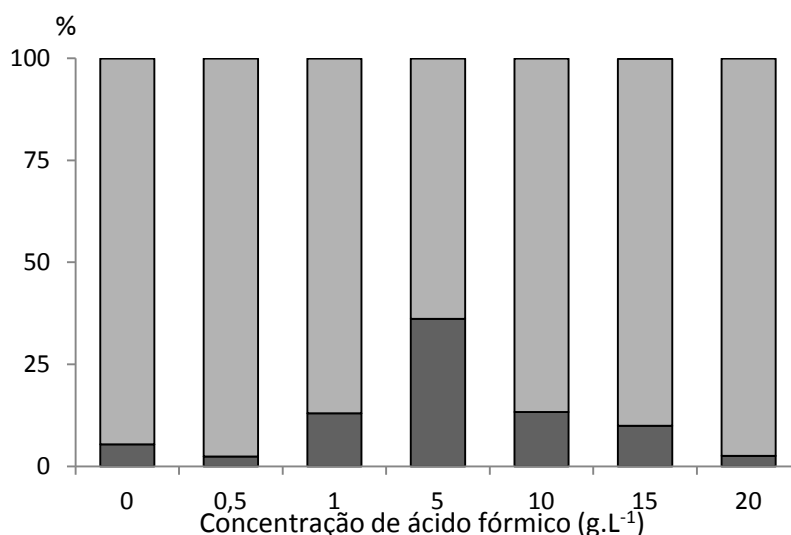


Figura 4.27- Células de *S. carlsbergensis*, recolhidas na fase de latência de ensaios de fermentação em presença de ácido fórmico, que apresentavam evidência de espécies reactivas de oxigénio (ROS): ■ Células normais; ■ Células com ROS.

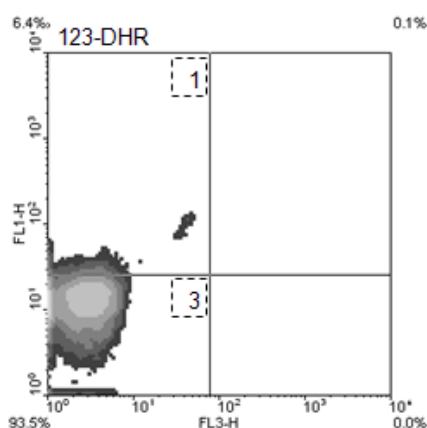


Figura 4.28- Citogramas referentes à presença de espécies reactivas de oxigénio (ROS) em células de *S. carlsbergensis* recolhidas na fase de latência do ensaio de fermentação sem inibidor e coradas com 123-DHR (1- Células com ROS; 3- Células normais).

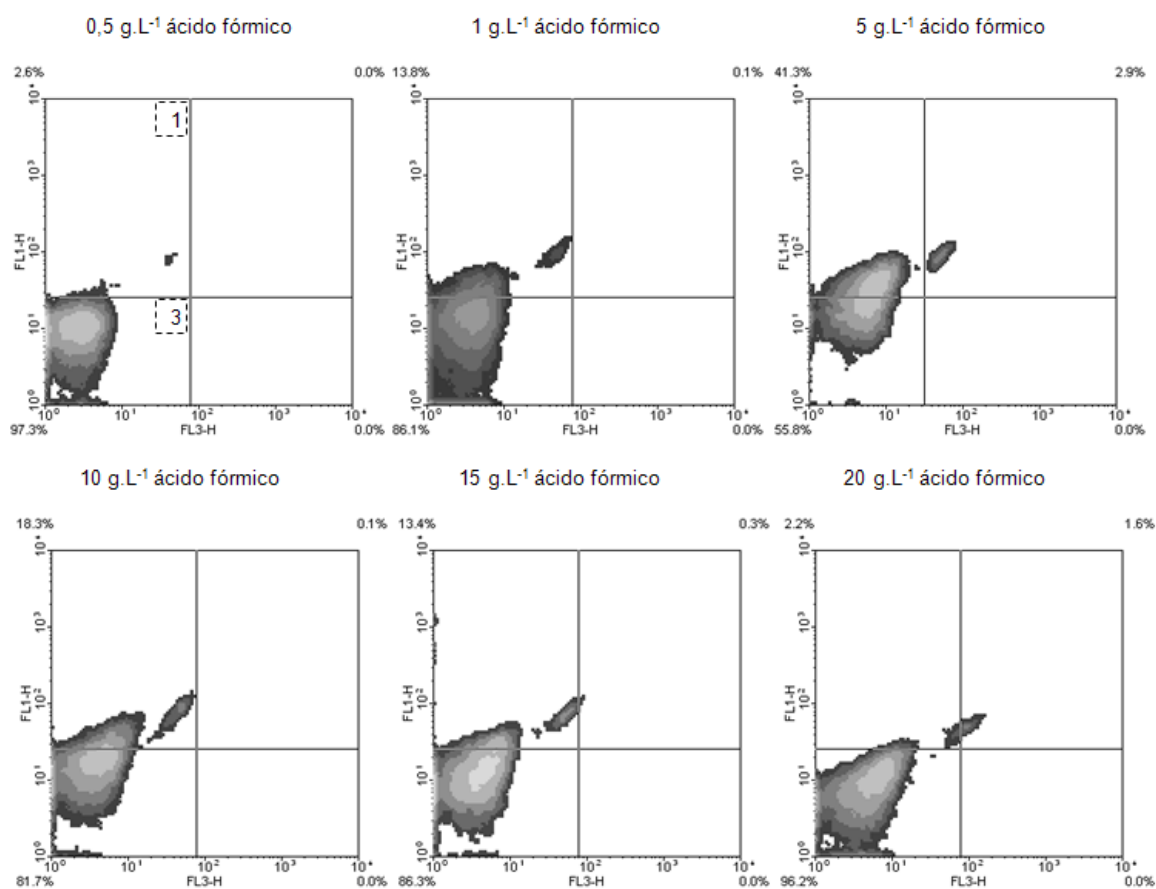


Figura 4.29- Citogramas referentes à presença de espécies reativas de oxigénio (ROS) em células de *S. carlsbergensis* recolhidas na fase de latência de ensaios de fermentação em presença de ácido fórmico e coradas com 123-DHR (1- Células com ROS; 3- Células normais).

Tal como foi referido anteriormente, nesta fase não é possível estabelecer uma correspondência entre a evolução das manchas referentes às percentagens de células normais e células com ROS, já que as células se encontram em fase de adaptação ao meio.

→ Fase exponencial

Nesta fase, não se verificaram nos ensaios com concentração de ácido fórmico até aos 5 g.L⁻¹ variações acentuadas em relação ao ensaio sem inibidor (figura 4.28). Contudo, verifica-se um aumento de células com ROS à medida que aumenta a

concentração de inibidor chegando a atingir 18% no ensaio de 20 g.L⁻¹, como se pode observar na figura 4.28.

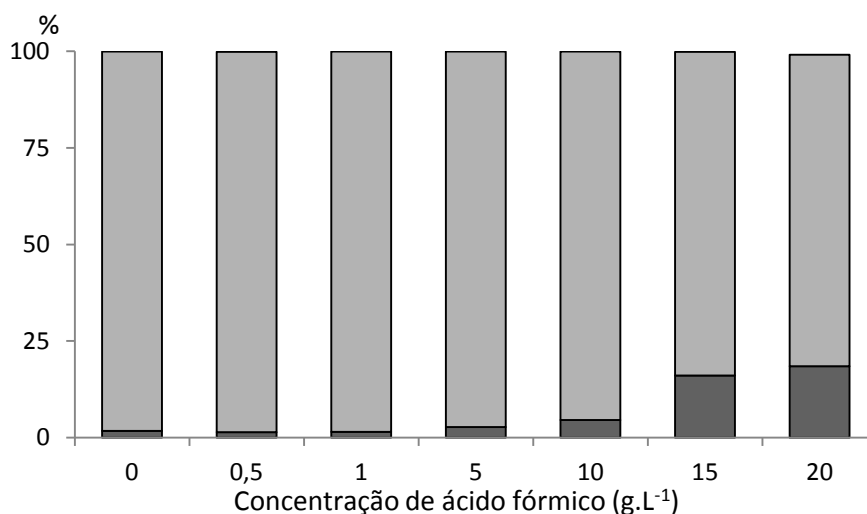


Figura 4.30- Células de *S. carlsbergensis*, recolhidas na fase exponencial de ensaios de fermentação em presença de ácido fórmico, que apresentavam evidência de espécies reactivas de oxigénio (ROS): ■ Células normais; ■ Células com ROS.

Esta observação pode ser confirmada na figura 4.29, em que a maior mancha para o ensaio sem inibidor foi identificada no quadrante 3, referindo-se a uma maior percentagem de células normais. Nesta fase as células com ROS representam uma subpopulação pouco visível no quadrante 1.

Nos citogramas da figura 4.30 pode ver-se a subida da população do quadrante 3 para o quadrante 1, com o aumento da concentração de inibidor, sendo mais acentuada nos ensaios com concentrações mais elevadas de ácido fórmico (15 g.L⁻¹ e 20 g.L⁻¹).

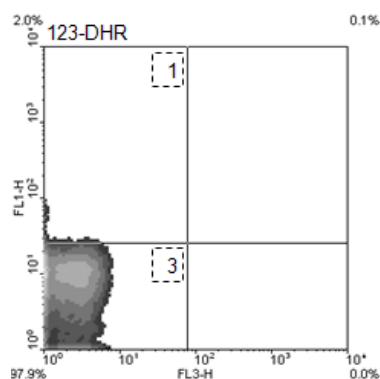


Figura 4.31- Citogramas referentes à presença de espécies reactivas de oxigénio (ROS) em células de *S. carlsbergensis* recolhidas na fase exponencial do ensaio de fermentação sem inibidor e coradas com 123-DHR no ensaio de controlo (1- células com ROS; 3- células normais).

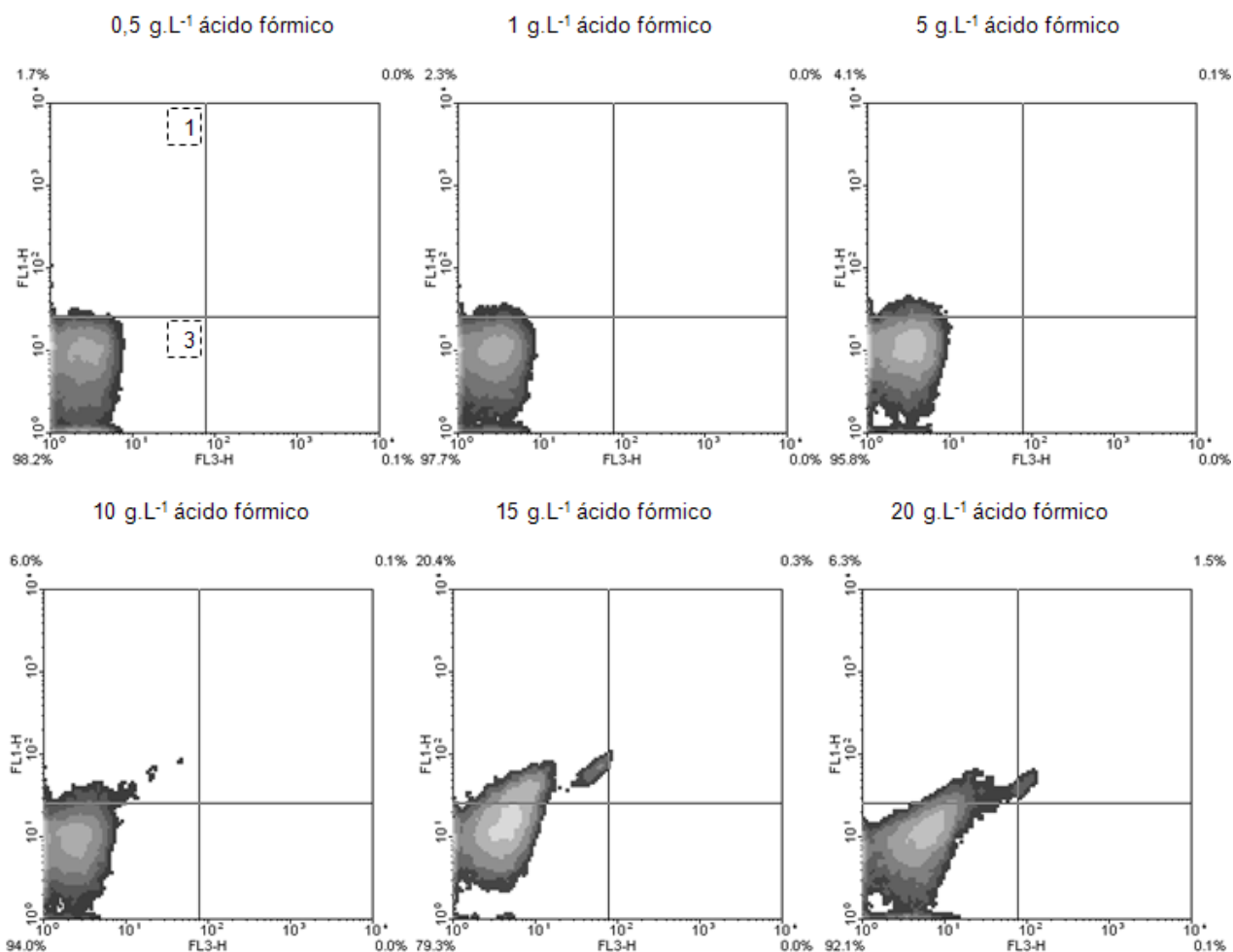


Figura 4.32- Citogramas referentes à presença de células com espécies reativas de oxigénio (ROS) em células de *S. carlsbergensis* recolhidas na fase exponencial de ensaios de fermentação em presença de ácido fórmico e coradas com 123-DHR (1- células com ROS; 3- células normais).

Para a concentração de 20 g.L⁻¹ de inibidor, detectou-se um decréscimo da percentagem de células com ROS, que estará provavelmente relacionado com a diminuição da produtividade em etanol neste ensaio, tendo-se obtido nesta fase, valores de concentração máxima mais baixos que terão diminuído de certo modo o efeito tóxico do etanol. O facto de a glucose não ter sido consumida na sua totalidade também poderá ter contribuído para o registo de menores percentagens de células com ROS neste ensaio.

→ Fase estacionária

Relativamente à fase exponencial verificou-se, de um modo geral, um aumento da percentagem de células com ROS, mantendo-se uma tendência crescente face ao aumento de concentração de inibidor, tal como se pode observar no gráfico da figura 4.31. O valor máximo de percentagem de células com ROS registou-se novamente no ensaio com 20 g.L⁻¹ de ácido fórmico.

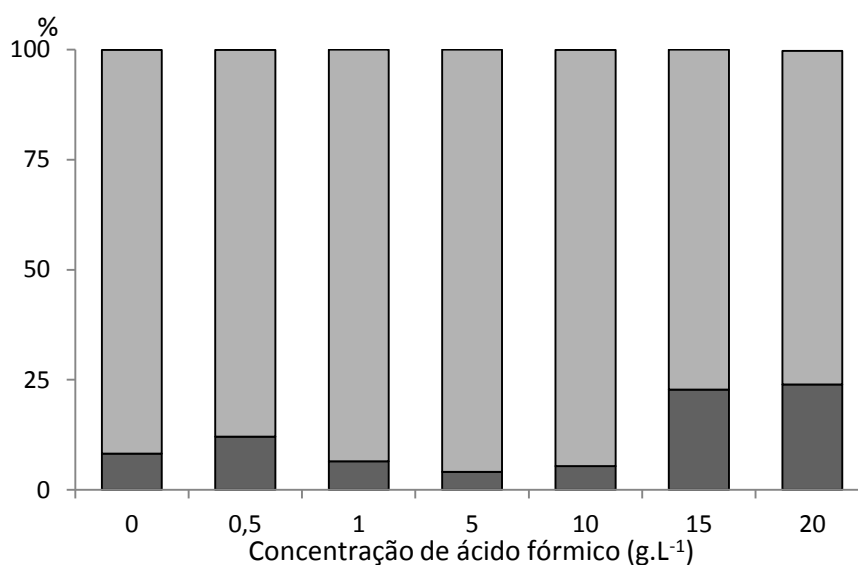


Figura 4.33- Células de *S. carlsbergensis*, recolhidas na fase estacionária de ensaios de fermentação em presença de ácido fórmico, que apresentavam evidência de espécies reactivas de oxigénio (ROS): □ Células normais; ■ Células com ROS.

No citograma da figura 4.32, relativo ao ensaio sem inibidor, foi possível verificar um aumento em relação à fase estacionária em relação à fase exponencial. Nesta fase, atinge-se o máximo de produção de etanol e as células parecem reagir através da produção de ROS.

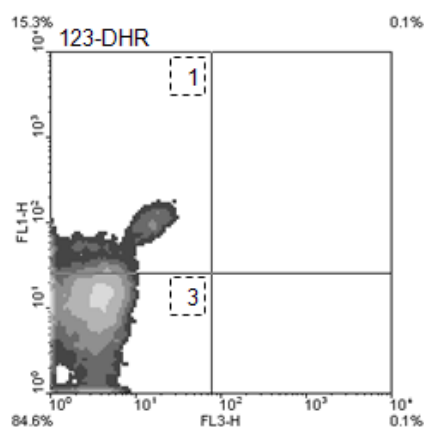


Figura 4.34- Citogramas referentes à presença espécies reactivas de oxigénio (ROS) em células de *S. carlsbergensis* recolhidas na fase estacionária do ensaio de fermentação sem inibidor e coradas com 123-DHR (1-células com ROS; 3- células normais).

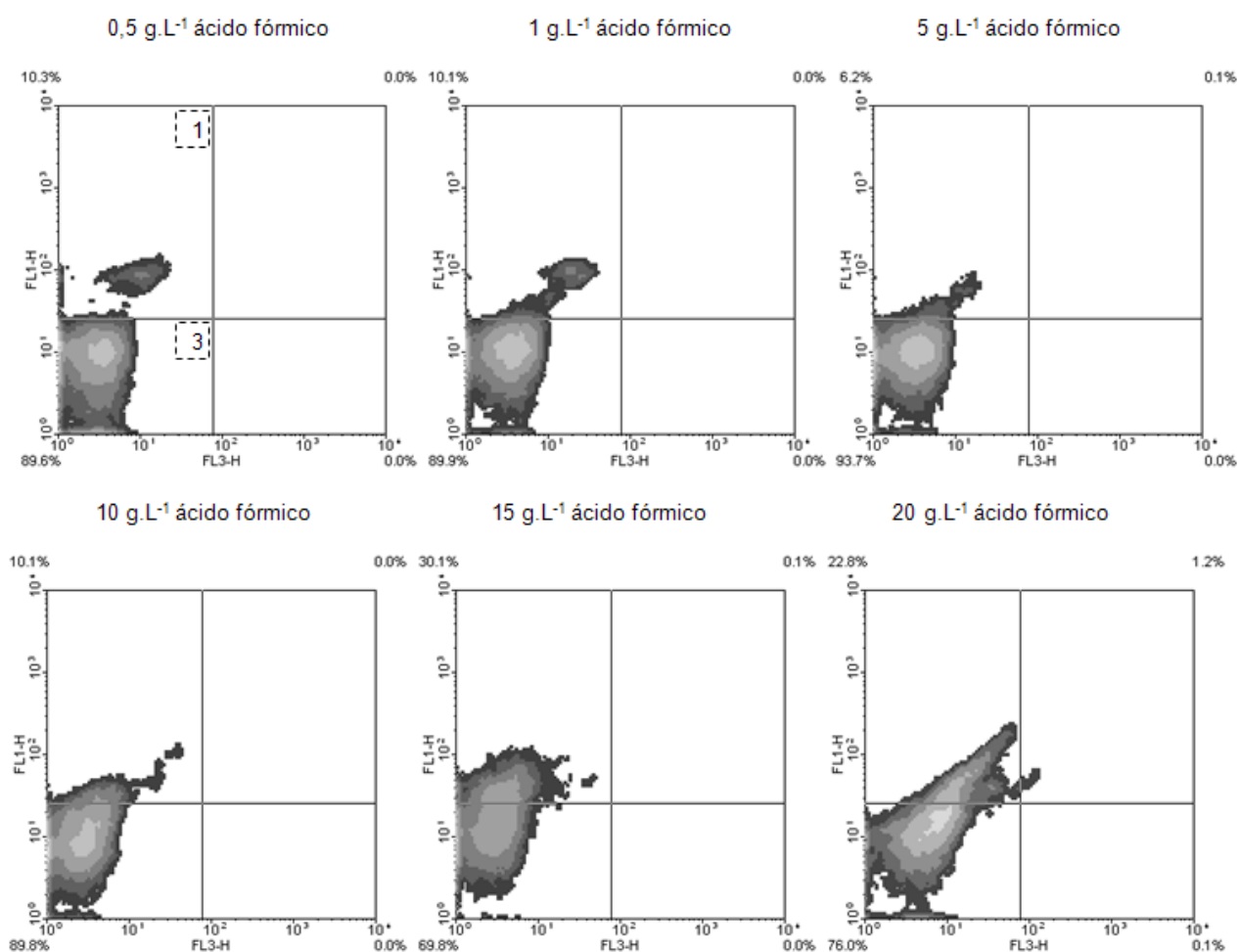


Figura 4.35- Citogramas referentes à presença de células com espécies reactivas de oxigénio (ROS) em células de *S. carlsbergensis* recolhidas na fase estacionária de ensaios de fermentação em presença de ácido fórmico e coradas com 123-DHR (1- células com ROS; 3- células normais).

Os citogramas apresentados na figura 4.33, confirmam a tendência de aumento da percentagem de células com ROS, através da subida da população para o quadrante 1 quando se aumenta a concentração de ácido fórmico no meio de fermentação.

→Fase de morte celular

Relativamente à fase estacionária, verificou-se que a percentagem de células com ROS aumenta ligeiramente no ensaio com 0,5 g.L⁻¹ (18%) diminuindo em relação ao ensaio sem inibidor nos ensaios com concentrações mais altas de ácido fórmico até atingir cerca de 8% para 20 g.L⁻¹, como se pode observar na figura 4.34.

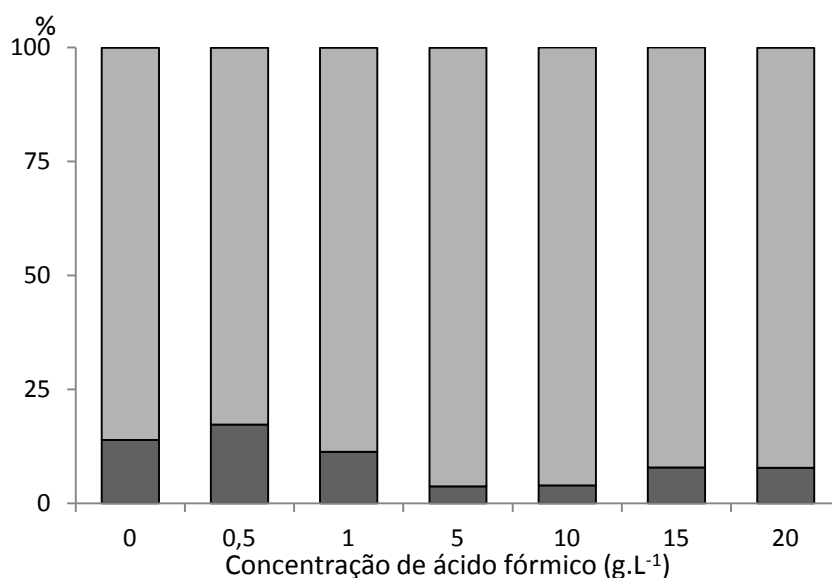


Figura 4.36- Células de *S. carlsbergensis*, recolhidas na fase de morte celular de ensaios de fermentação em presença de ácido fórmico, que apresentavam evidência de espécies reactivas de oxigénio (ROS): ■ Células normais; ■ Células com ROS..

No ensaio sem inibidor (figura 4.35), bem como nos ensaios com concentrações mais baixas de inibidor (0,5 g.L⁻¹ e 1 g.L⁻¹), a população de células com ROS (quadrante 1) corresponde a uma percentagem maior, comparativamente aos ensaios com concentrações superiores de ácido fórmico (figura 4.36). Na presença de concentrações mais elevadas de inibidor, a produção de etanol é menor (figura 4.5), pelo que menores percentagens de células serão oxidadas, formando ROS. Por outro lado, no ensaio sem inibidor e nos de baixas concentrações de ácido fórmico, o pH decresce acentuadamente nesta fase, o que, sendo um factor de stresse, poderá também contribuir para a formação de ROS (Landolfo *et al.*, 2008).

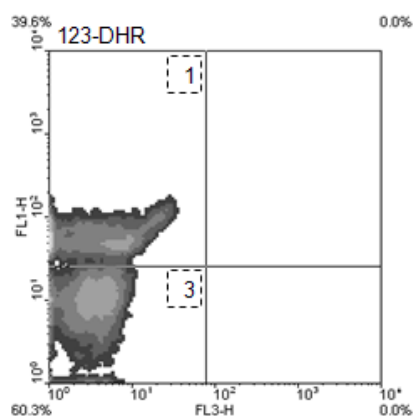


Figura 4.37- Citogramas referentes à presença de células com espécies reativas de oxigênio (ROS) em células de *S. carlsbergensis* recolhidas na fase de morte celular do ensaio de fermentação sem inibidor e coradas com 123-DHR (1- células com ROS; 3- células normais).

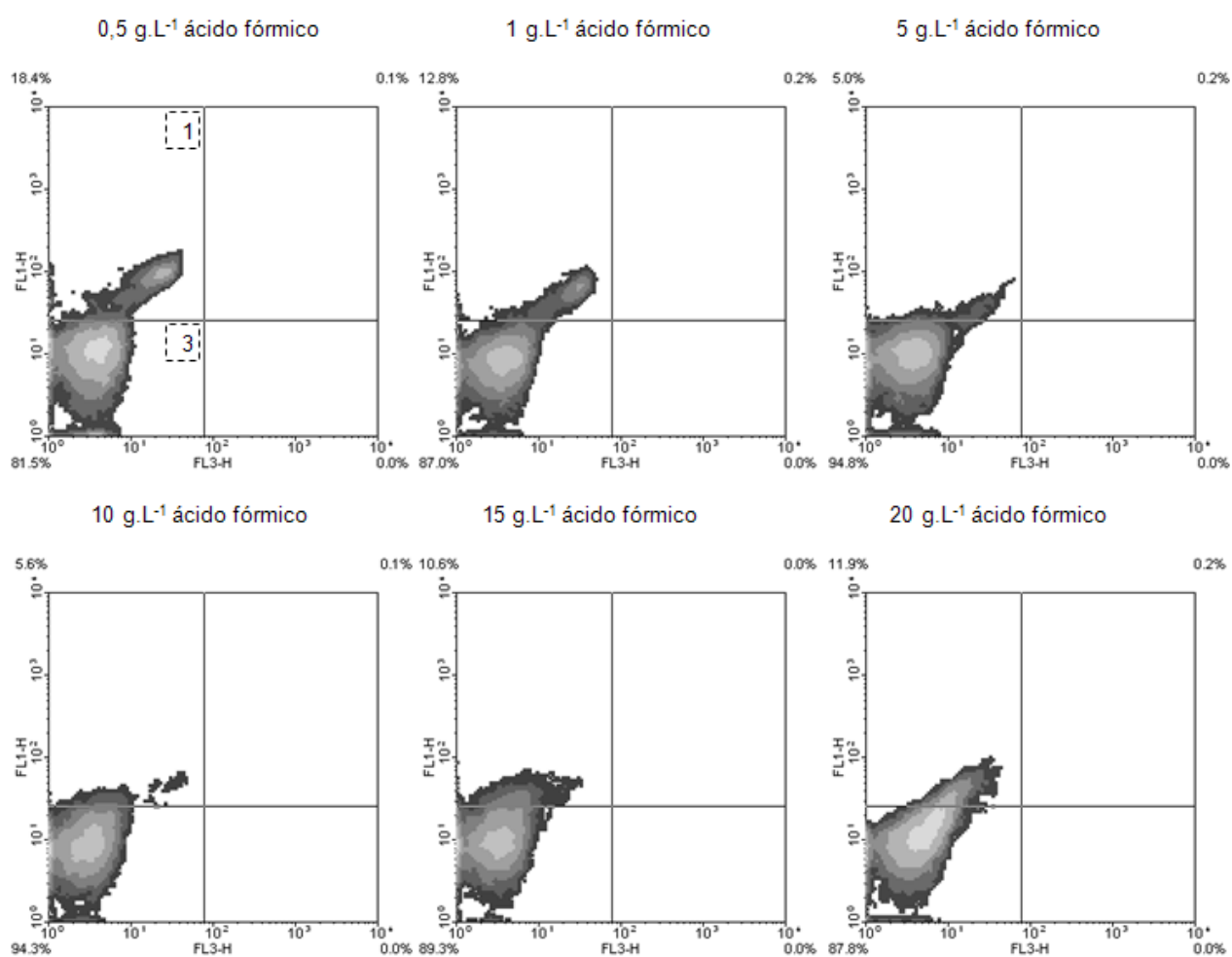


Figura 4.38- Citogramas referentes à presença de células com espécies reativas de oxigênio (ROS) em células de *S. carlsbergensis* recolhidas na fase de morte celular de ensaios de fermentação em presença de ácido fórmico e coradas com 123-DHR (1- células com ROS; 3- células normais).

Nesta fase, a presença de células com ROS em percentagens ainda acentuadas, confirmou a acumulação destas espécies, o que significa que os mecanismos de resistência ao stresse durante a fase estacionária (na qual as células estão sujeitas a limitação nutricional) poderão estar a ser afectados. A figura 4.36 confirma a descida da população de células com ROS do quadrante 1 para o 3, até ao ensaio com 10 g.L^{-1} . Nos ensaios com concentrações superiores de inibidor, verificou-se a subida da subpopulação do quadrante 3 para o 1.

5 Conclusões e trabalho futuro

Este trabalho consistiu no estudo de efeito da presença de ácido fórmico em processos de fermentação para produção de bioetanol usando a estirpe *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 6269.

A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que, relativamente à produção de biomassa (concentração máxima e rendimento), a resposta da levedura *S. carlsbergensis* ao aumento de concentração de ácido fórmico provocou uma diminuição acentuada para concentrações acima dos 1 g.L⁻¹ de inibidor, atingindo reduções superiores a 50% com níveis de 20 g.L⁻¹. A variação das taxas específicas de crescimento acompanhou estes resultados sofrendo uma redução em 80% com a concentração mais elevada de inibidor.

Verificou-se também que apenas na presença de 20 g.L⁻¹ de ácido fórmico não houve consumo total de glucose, tendo havido um decréscimo acentuado na produção de etanol de 22,5 para 15,2 g.L⁻¹ a esta concentração. Contudo, em termos de rendimento, a redução não foi tão drástica (14%).

Embora o aumento de concentração de ácido fórmico tenha induzido respostas de stresse na levedura, verificou-se que esta continuou a consumir a fonte de carbono e a produzir etanol. Deste modo, no que diz respeito à produção de etanol, os resultados mostram a levedura *S. carlsbergensis*, pode ser interessante do ponto de vista industrial para a produção deste biocombustível a partir de hidrolisados lenhocelulósicos que contêm ácido fórmico.

As análises realizadas por citometria de fluxo multiparamétrica permitiram a avaliação do estado das células em cada fase da fermentação, no sentido de caracterizar a sua resposta ao stresse provocado pelas concentrações crescentes de ácido fórmico. Verificou-se que as células começam a indiciar sinais de stresse para concentrações de inibidor superiores a 5 g.L⁻¹ detectando-se maiores percentagens de células com membrana despolarizada e espécies reactivas de oxigénio.

Os resultados obtidos demonstraram que a citometria de fluxo multiparamétrica pode ser um método interessante na área da produção de bioetanol por fermentação alcoólica, permitindo a monitorização das células de levedura quase em tempo real, pois revela o estado fisiológico das células, permitindo alterar a estratégia do controlo do processo de forma a aumentar o rendimento do mesmo.

Embora o comportamento fisiológico desta levedura pareça indicar que é adequada para a produção de bioetanol a partir da fermentação alcoólica de hidrolisados lenhocelulósicos, a continuação deste trabalho poderá passar por estudar ainda a sua resposta em presença de outros inibidores como o hidroximetilfurfural ou o ácido levulínico, bem como pela realização de ensaios considerando a mistura de vários inibidores. Será igualmente importante estudar o comportamento desta levedura perante ensaios com hidrolisados lenhocelulósicos, de modo a caracterizar a resposta numa situação mais próxima do cenário industrial

Bibliografia

Andrade, R. (2010). *Estudo do desenvolvimento e da produtividade lipídica da levedura Rhodotorula glutinis NCYC 921 em culturas descontínuas monitorizadas por citometria de fluxo*, Dissertação de Mestrado pela Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

Almeida, J.R.M., Modig, T., Petersson, A., Hahn-Hägerdal, B., Lidén, G., Gorwa-Grauslund, M.F. (2007). *Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, Vol. 82, 340-349.

Attfield, P., Bell, P.J.L., Kletsas, S., Van Rooijen, R., Veal, D.A. (2008). *Use of flow cytometry to monitor cell damage and predict fermentation activity of dried yeasts*, Journal of Applied Microbiology, Vol.89, 207-214.

Bai, F., Zhao, X. (2009). *Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production*, Journal of Biotechnology, Vol.144, 23-30.

Balata, M., Balata, H., Oz, C. (2008). *Progress in bioethanol processing*. Progress in Energy and Combustion Science, Vol. 34(5), 551-573.

Côrte-Real, M., Sansonetty, F., Ludovico, P., Prudêncio, C. Rodrigues, F., Fortuna, M., Sousa, M.J., da Silva, M.T., Leão, C. (2002). *Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras*. Boletim de Biotecnologia, Vol. 71, 19-33.

da Silva, T.L., Reis, A., Hewitt, C., Roseiro, J.C. (2004). *Citometria de fluxo – Funcionalidade celular on-line em bioprocessos*. Boletim de Biotecnologia, Vol. 77, 32-40.

da Silva, T., Reis, A., Kent, C.A., Kosseva, M., Roseiro, J.C., Hewitt, C.J. (2005a). *Monitoring population dynamics of the thermophilic Bacillus licheniformis CCMI 1034 in*

batch and continuous cultures using multi-parameter flow cytometry. Journal of Biotechnology, Vol.115, 199-210.

da Silva, T., Reis, A., Kent, C.A., Kosseva, M., Roseiro, J.C., Hewitt, C.J. (2005b). *Stress induced physiological responses to starvation periods as well as glucose and lactose pulses in Bacillus licheniformis CCMI 1034 in continuous aerobic fermentation processes as measured by multi-parameter flow cytometry.* Biochemical Engineering Journal, Vol, 24, 31-41.

da Silva, T., Reis, A., Roseiro, J.C., Hewitt, C.J. (2008). *Physiological effects of the addition of n-dodecane as an oxygen vector during steady-state Bacillus licheniformis thermophilic fermentations perturbed by a starvation period or glucose pulse.* Biochemical Engineering Journal, Vol. 42, 208-216.

da Silva, T., Mileu, J., Piecova, L., Roseiro, J. (2009). *A comparative study using the dual staining flow cytometric protocol applied to Lactobacillus rhamnosus and Bacillus licheniformis batch cultures.* Enzyme and Microbial Technology, Vol. 45, 134-138.

da Silva, T., Reis, A., Feijão, D. (2010). *Multiparameter flow cytometry to monitor the yeast Rhodotorula glutinis CCMI 145 Batch growth and oil production towards biodiesel.* Applied biochemistry and biotechnology, Vol. 162(8), 2166-2176.

Diniz, D. (2008). *Produção de álcool etílico utilizando como matérias primas resíduos florestais e agrícolas*, Dissertação de Mestrado apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.

Duarte, L., Carvalheiro, F., Neves, I., Gírio, F. (2005). *Effects of Aliphatic Acids, Furfural, and Phenolic Compounds on Debaryomyces hansenii CCMI 941.* Applied Biochemistry and Biotechnology Vol. 121–124, 413-426. ISSN: 0273–2289.

Ferreira, W., Sousa, J. (1998). *Microbiologia Volume I.* Lidel, ISBN-978-972-757-024-9.

Gírio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R. (2010). *Hemicelluloses for fuel ethanol: A review*. Bioresource Technology, Vol. 101, 4775-4800.

Hu, C., Wu, S., Zhao J., Zhao, X., Zhao, Z. (2009). *Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides*. Bioresource Technology, Vol. 100, 4843-4847.

Kobayashi, M., Hiroshi S., Shioya, S. (2007). *Physiological analysis of yeasts cells by flow cytometry during serial-repitching of low-malt beer fermentation*. Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 102, No.5, 451-456.

Kondo, A., Matsuda, F., Tomohisa, H., Tomoya, S. (2011). *Repeated batch fermentation of lignocellulosic hydrolysate to ethanol using a hybrid Saccharomyces cerevisiae strain metabolically engineered for tolerance to acetic and formic acids*. Bioresource technology, Vol. 102, 7919- 7924.

Landolfo, S., Politi, H., Angelozzi, D., Mannazzu, I. (2008). *ROS accumulation and oxidative damage to cell structures in Saccharomyces cerevisiae wine strains during fermentation of high-sugar-containing medium*. Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1780, 892-898.

Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B., Tengborg, C., Stenberg, K., Zacchi, G., Nilvebrant, N. (1999). *The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood*, Enzyme and Microbial Technology Vol. 24,151–159.

Lloyd, D., Moran, C.A., Suller, M.T.E., Dinsdale, M.G. (1996). *Flow cytometric monitoring of rhodamine 123 and a cyanine dye uptake by yeast during cider fermentation*. Journal of the Institute of Brewing, Vol. 102, 251-259.

Martin, M. (2011). *Improving the environmental performance of biofuels with industrial symbiosis*. Biomass and Bioenergy, Vol.35-5, 1747-1755.

Miller, G.L. (1959). *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*. Analytical Chemistry, Vol. 31, N° 3, 426-428.

Mira, N.P., Teixeira, M.C., Sá-Correia, I. (2010). *Adaptive Response and Tolerance to Weak Acids in Saccharomyces cerevisiae: A Genome-Wide View*. Journal of Integrative Biology, Vol.14, N°5, 525-540.

Mussatto, S., Dragone, G., Guimarães, P., Silva, J.P.A., Carneiro, L.M., Roberto, I.C., Vicente, A., Domingues, L., Teixeira, J. A. (2010). *Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production*, Biotechnology Advances V-28: 817–830.

Palmqvist, E., Grage, H., Meinander, N., Hanh-Hägerdal, B. (1999). *Main and interaction effects of acetic acid, furfural and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts*. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 63, 46-55.

Palmqvist, E., Hanh-Hägerdal, B. (2000). *Fermentation of lignocellulosic hydrolysates: inhibitors and mechanisms of inhibition*. Bioresource Technology, Vol. 74, 17-33.

Pampulha, M.E., Loureiro-Dias, M.C. (1989). *Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeasts*. Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 31, 547-550.

Saxena, R.C., Adhikari, D.K., Goyal, H.B. (2009). *Biomass based energy fuel through biochemical routes: A review*. Renewable & Sustainable Energy Reviews, Vol. 13, 167-178.

Talebnia, F., Karakashev, D., Angelidaki, I. (2010). *Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation*. Bioresource Technology, Vol. 101, 4744-4753.

Biofuels Platform. ENERS Energy Concept. Production of biofuels in the world; 2010 (disponível online em: <http://www.biofuels-platform.ch/en/home/index.php>, consultado a 5 de Setembro de 2011).

Intelligent Energy Europe Biofuels topping up the fuel mix – Project report, 2008 (disponível online em: http://www.energy.eu/publications/EA8008325ENC_002.pdf, consultado a 2 de Setembro de 2011).

Anexo I – Reagentes químicos

Tabela 0.1 – Reagentes químicos utilizados nos ensaios de fermentação e análise de amostras.

Nome	PM	Fórmula	Pureza	Marca	Utilização
Ácido bis-(1,3-dibutilbarbitúrico) pentametino oxonol (BOX)	542,67	$C_{29}H_{42}N_4O_6$	-	Biochemika	CF
Ácido 3,5-dinitrossalicílico	228,12	$C_7H_6O_5 \cdot H_2O$	-	Merck	DNS
Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA)	372,24	$C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$	99%	Merck	CF
Ácido fórmico	46,03	CH_2O_2	98%	Merck	F; HPLC
Ácido Sulfúrico	98,08	H_2SO_4	95-97%	Sigma	HPLC
Agar	-	-	-	Merck	MR
Cianina carbonil m-clorofenilhidrazona (CCCP)	204,62	$C_9H_5ClN_4$	-	Sigma	CF
Dihidrogenofosfato de potássio	136,09	KH_2PO_4	99%	Panreac	MC
123-dihidrorodamina	346,38	$C_{21}H_{18}N_2O_3$	-	Invitrogen	CF
Etanol	46,07	C_2H_5OH	99,5%	Panreac	GC
Extracto de levedura	-	-	-	Biokar Diagnostics	MC; MR
D-Glucose anidro	180,16	$C_6H_{12}O_6$	99,5%	Pronolab	MC; MR; DNS; GC
Hidróxido de sódio	40,04	$NaOH$	99,5%	V.P.	F
Iodeto de 3,3'-dihexiloxacarbocianina $DiOC_6(3)$	572,23	$C_{29}H_{37}IN_2O_2$	-	Invitrogen	CF
Iodeto de propídio (PI)	668,4	$C_{27}H_{34}I_2N_4$	-	Invitrogen	CF
2-Propanol	60,1	C_3H_8O	99%	Merck	GC
Peptona	-	-	-	BD	MR
Solução tampão salina	-	-	-	Oxoid	CF
Sufato de amónio	132,14	$(NH_4)_2SO_4$	99,6%	Panreac	MC
Sulfato de magnésio heptahidratado	246,48	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	99,5%	Merck	MC
Tartarato duplo de sódio e potássio	282,23	$C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$	99%	Panreac	DNS
CF– Citometria de fluxo; DNS– Quantificação da glucose residual; F– Fermentação; GC– Cromatografia gasosa; HPLC– Cromatografia líquida de alta eficiência; MC– Meio de cultura completo; MR– Meio de repicagem.					

Anexo II – Correlação entre a absorvância e a concentração de biomassa seca

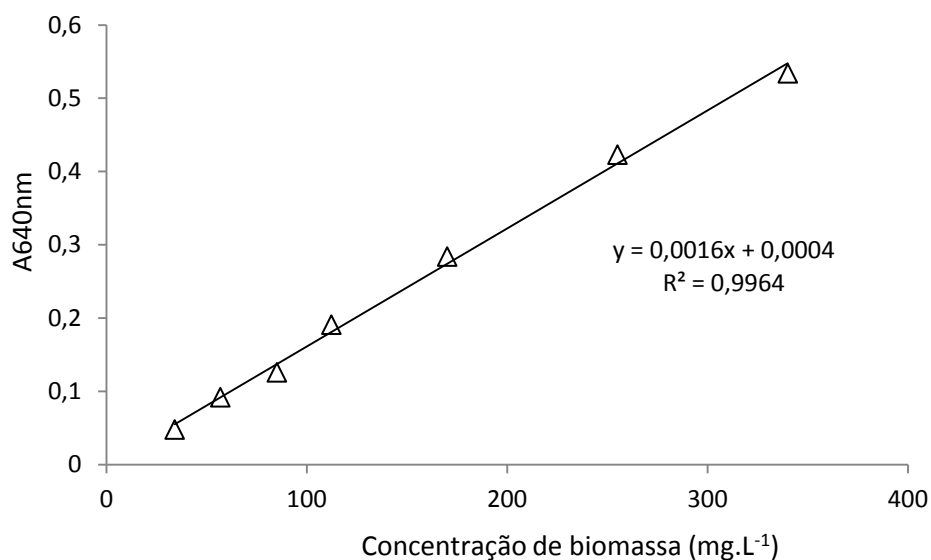


Figura 0.1 – Correlação entre a absorvância 640 nm e a concentração de biomassa seca para culturas de *S. carlsbergensis*.

A equação da recta que estabelece a relação linear entre a absorvância a 640nm e concentração de biomassa seca é:

- concentração de biomassa seca (mg.L⁻¹)
- absorvância da suspensão a 640 nm.

O coeficiente de correlação (R^2) obtido foi de 0,9964.